



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZ PLÖREZİDE SERUM VE PLEVRAL SIVI
ÖRNEKLERİNDE EARLY SECRETED ANTİGENİC TARGET- 6
(ESAT-6) VE CULTURE FILTRATE PROTEİN- 10 (CFP-10)
ANTİJENLERİNE SPESİFİK T- LENFOSİTLERİ ANALİZİNİN
TANISAL DEĞERİ**

**Uzmanlık Tezi
Dr. Serap ÇAKIR**

Ankara, 2009



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZ PLÖREZİDE SERUM VE PLEVRAL SIVI
ÖRNEKLERİNDE EARLY SECRETED ANTİGENİC TARGET- 6
(ESAT-6) VE CULTURE FILTRATE PROTEIN- 10 (CFP-10)
ANTİJENLERİNE SPESİFİK T- LENFOSİTLERİ ANALİZİNİN
TANISAL DEĞERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Serap ÇAKIR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Müşerref Şule AKÇAY

TUBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu

Hızlı Destek Projesi No: 108S117

Ankara, 2009

ÖZET

Tüberküloz (TB) plörezi, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infeksiyonunun en sık görülen ekstrapulmoner tutulumudur. Tüm TB vakalarının ortalama %37.4'ünde bulunur. Ülkemizin pek çok yerinde eksudatif plörezinin sebepleri arasında TB ilk sırada yer alır. Ancak TB plörezi tanısında güçlükler vardır. Standart tanısal yöntemlerle plevral sıvı analizi yaparak TB plörezi tanısı koymak zordur. TB plörezi düşünülen hastaların tanısında daha az invaziv, hızlı, duyarlı ve özgül immunolojik tanı yöntemlerine gereksinim vardır.

Bu araştırmada, plevral sıvı, plevral doku kültürü veya histolojik olarak TB plörezi tanısı konmuş hastaların plevral sıvılarında ve kanlarında ELİSPOT yöntemiyle T SPOT.TB testi çalışarak, testin TB plörezideki tanı değeri araştırıldı. Bu amaçla, TB plörezi tanılı (n=10) ve konjestif kalp yetmezliğine bağlı transüdatif plevral efüzyonu olan (n=20) toplam 30 olgunun dahil edildiği prospektif bir çalışma yürütüldü.

Transüdatif efüzyonu olan hastaların ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine spesifik T-lenfositleri cevabında serum ve plevral sıvıda fark izlenmedi. Ancak TB plörezili hastalarda plevra ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verilen cevabın serum ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verilen cevaba göre anlamlı olarak yüksek olduğu izlendi (p<0.05).

Toplam hücre sayısında, transüdatif efüzyonu olan hastaların serum ve plevra arasında fark saptanmazken TB plörezide serum ve plevral sıvıda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı (p<0.05).

Sonuçlarımız, TB plörezide T-SPOT.TB testinin serum ve plevrada uygulanarak MTB-spesifik T-lenfositlerin plevral sıvıdaki sayılarının serumdaki sayılarına göre daha yüksek olduğunun gösterilmesinin TB plörezi tanısına katkı sağlayacağını desteklemektedir. Ancak olgu sayısının azlığı göz önüne alındığında bu konuyla ilgili yapılacak geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz plörezi, ESAT-6 ve CFP-10 spesifik T lenfositler, ELISPOOT,

İNGİLİZCE ÖZET

Diagnostic value of Early Secreted Antigenic Target 6 (ESAT-6) and Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10) specific T lymphocytes analysis in pleural effusion and serum for tuberculous pleurisy.

Tuberculous (TB) pleurisy is the most common extrapulmonary manifestation of the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection, accounting for up to 37.4 percent of tuberculosis cases. In our country it is the most frequent cause of exudative pleural effusions. Although there are difficulties for the diagnosis of TB pleurisy. Because the diagnosis of TB pleurisy by the analysis of pleural effusions with standard diagnostic tools is difficult. The sensitivity for the detection of active TB infection is higher in pleural biopsies compared to pleural fluid, although the procedure is invasive. When the frequency and diagnostic difficulties of TB pleurisy are considered, its certain that a more sensitive, specific and less invasive test for detection of TB pleurisy infection is required.

In this study our objective is to determine antigen specific T cells by using ELISPOT assay on peripheral blood mononuclear and pleural effusion mononuclear cells in patients with diagnosed TB pleurisy . We conducted a prospective study enrolling a total of 30 participants with diagnosed TB pleurisy (n=10) and patients with transudative pleural effusions due to congestive heart failure (n=20).

There was no difference between the specific T lymphocyte answers of serum and pleural ESAT-6 and CFP-10 antigens in patients with transudative pleural effusions. Although the answers of pleural ESAT-6 and CFP-10 antigens were higher then the answers of serum ESAT-6 and CFP-10 antigens in patients with diagnosed TB pleurisy (p<0.05).

The difference between total cell counts were not determined in serum and pleural effusion in patients with transudative pleural effusions although it was significantly higher in serum and pleural effusion in patients with diagnosed TB pleurisy (p<0.05).

The results of our study supports that enumerating effector T cells by ELISPOT at the site of pleural effusion should enable more specific diagnosis of TB pleurisy than enumerating effector T cells in the blood alone. However larger, prospective studies are required to confirm these results.

Keywords: Tuberculous pleurisy, ESAT-6 and CFP-10 specific T lymphocytes, ELISPOT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak.....	ii
Özet.....	iii
İngilizce Özet.....	iv
İçindekiler.....	v
Şekiller	vii
Tablolar.....	viii
Teşekkür.....	ix
Simgeler ve Kısaltmalar.....	x
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	3
2.2. Tüberküloz Basilinin Genel Özellikleri.....	4
2.3. Tüberkülozda Bulaşma Yolları.....	5
2.4. Tüberkülozda İmmün Yanıt ve Patogenez.....	6
2.4.1. Patogenezin Evreleri	
2.5. Tüberküloz Patolojisi	12
2.6. Tüberküloz Tanı Yöntemleri.....	13
2.6.1. Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri	
2.6.2. Moleküler Biyolojik Yöntemler	
2.7. Latent Tüberküloz Enfeksiyon Tanısı.....	16
2.7.1. Tüberkülin Cilt Testi	
2.7.2. Serum Interferon-γ Testleri	
2.8. Tüberküloz Plörezi.....	24
2.8.1. Patogenez	
2.8.2. Klinik Bulgular ve Tanı	
3. Gereç ve Yöntem.....	28
3.1. TCT.....	29

3.2. Torasentez.....	29
3.3. T-SPOT.TB.....	29
3.3.1. Gerekli Malzeme ve Gereçler	
3.3.2. Diğer Gereçler	
3.3.3. Testin Yapılışı	
3.3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	
3.4. Plevral Sıvı Analizi ve T.SPOT.TB.....	32
3.4.1. Gerekli Malzeme ve Gereçler	
3.4.2. Plevral Sıvıda Testin Yapılışı	
3.5. İstatistiksel Analiz.....	33
4. Bulgular.....	34
4.1. Transüdatif Plevral Efüzyonu Olan Hastalar (Grup I).....	39
4.2. TB Plörezi Tanılı Hastalar (Grup II).....	40
5. Tartışma.....	42
6. Sonuç.....	46
7. Kaynaklar.....	47

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikobakterileri hücre duvarı.....	5
Şekil 2.2. EZN ile boyanmış preparatta <i>M.tuberculosis</i> basilleri.....	14
Şekil 2.3. Mantoux deri testi.....	17
Şekil 2.4 TST, T-SPOT. <i>TB</i> ve ELISA çalışma prensipler (45).....	21
Şekil 3.1. Anti-IFN- γ monoklonal antikorları ile kaplı 96 kuyucuktan oluşan test plağı, ESAT-6 ve CFP-10 antijen solusyonları, pozitif kontrollere için PHA solusyonu. T-SPOT. <i>TB</i> (Oxford Immunotec, Oxford, UK).....	30
Şekil 3.2. Üst panelde pozitif, alt panelde negatif bir test sonucu izlenmektedir.....	32

TABLolar

Sayfa	
Tablo 2.1. T-hücrelerinde IFN- γ araştırmasına dayanan testler ve özellikleri (46).....	22
Tablo 2.2. TCT ve IFN- γ araştırmasına dayanan testlerin performans ve işlevsel özellikleri	(47)
.....	22
Tablo 4.1. Sosyodemografik özellikler.....	34
Tablo 4.2. Gruplara göre serum TCT sonuçları.....	35
Tablo 4.3. Grup genelinde TCT ve serum T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçlarının karşılaştırılması	35
Tablo 4.4. Grup genelinde TCT ve plevra T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçlarının karşılaştırılması	35
Tablo 4.5. Gruplara göre serum T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçları.....	36
Tablo 4.6. Gruplara göre plevra T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçları.....	36
Tablo 4.7. Gruplara göre serum ve plevra ESAT-6 ve CFP-10 sonuçlarının karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.8. Gruplara göre serum ve plevra ESAT-6 ve CFP-10 panellerinde oluşan spot sayılarının karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.9. Gruplara göre plevral sıvı ADA sonuçları.....	38
Tablo 4.10. Cinsiyete göre serum T-SPOT.<i>TB</i> test sonuçları.....	38
Tablo 4.11. Grupların biyokimyasal analizlerinin karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.12. Transüdatif efüzyonlu hastalarda serum T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçları-cinsiyet ilişkisi.....	39
Tablo 4.13. Transüdatif efüzyonlu hastalarda plevral sıvı ve serum T-SPOT. <i>TB</i> test	

sonuçları.....	40
Tablo 4.14. TB plörezili hastalarda serum T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçları- cinsiyet ilişkisi	40
Tablo 4.15. TB plörezili hastalarda plevral sıvı ve serum T-SPOT. <i>TB</i> test sonuçları..	41
Tablo 4.16. TB plörezide ADA ve T-SPOT. <i>TB</i> sonuçlarının karşılaştırılması.....	41

TEŞEKKÜR

Göğüs Hastalıkları ihtisasımı en iyi şekilde tamamlamamı sağlamam için gerekli imkanları sağlayan Sayın Rektörümüz Prof. Dr. Mehmet Haberal'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Füsün Öner Eyüboğlu'na; azimli ve çalışkan kişiliğiyle her zaman örnek aldığım değerli Tez Hocam Doç. Dr. Şule Akçay'a; değerli bilgi ve tecrübelerini paylaştığı Sayın Hocam Doç. Dr. Gaye Ulubay'a; tezimin her aşamasında destek veren sevgili Dr. Aslı Görek'e, laboratuvar çalışmalarında her zaman yanımda olan ve kıymetli emeğini esirgemeyen laboratuvar teknisyeni sevgili Elif Erdem'e; istatistiksel analiz aşamasındaki yardımları nedeniyle Yrd. Doç.Dr. Canan Yazıcı'ya , birlikte çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Başkent Hastanesi çalışanlarına;

Çalışmamıza sağladıkları destek nedeniyle TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'na;

Veri toplanması aşamasındaki katkılarından dolayı Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi hekimlerinden Sayın Doç. Dr. Nermin Çapan, Sayın Dr.Müjgan Güler ve Dr. Abdullah Şimşek'e;

Hayatım boyunca sahip olmaktan dolayı kendimi çok şanslı hissettiğim aileme, her zaman yanımda olan, sevgisi ve emeğiyle desteğini esirgemeyen sevgili eşime en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA:Adenozin deaminaz

ARB: Aside dirençli basil

BCG: Bacille Calmette Guerin

CFP-10: Culture filtrate protein

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ELISPOT: Enzyme linked immunospot

ESAT-6: Early Secreted Antigenic Target 6kDa protein

GM-CSF: Granülosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör

IFN- γ : Interferon gama

LTBI: Latent tüberküloz enfeksiyonu

NAP: p-nitro-o-asetil-amino-3-hidroksipropifenon

NTM: Tüberküloz dışı mikobakteriler

PPD: Purified Protein Derivative=Saflaştırılmış protein türevi

RD: Region of difference

TB: Tüberküloz

TCT: Tüberkülin cilt testi

TGF- β : Transforming growth factor-beta

TN F- α : Tümör Nekroz Faktör alfa

PHA: Phitohemaglütinin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz (TB), dünyada infeksiyon hastalıklarına bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Genellikle 15-49 yaşlar arasındaki genç popülasyonu etkiler ve tedavi edilebilir ölüm nedenlerinden biridir. *M. tuberculosis* basili (MTB) ile infekte bireylerde pek çok inflamatuvar hücrenin yer aldığı güçlü bir immün yanıt gelişir. Hücresel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları TB patogenezinin esasını oluşturur. Gelişen immün yanıt sonucu infekte kişilerin %95'inde olay sessiz olarak kalır. Bu klinik tablo "latent tüberküloz infeksiyonu" (LTBI) olarak tanımlanır. Fakat çeşitli nedenlerle immün sistemi baskılanmış kişilerde basile maruz kalmayı takiben klinik hastalık tablosu ortaya çıkabilir. Basili olan bireylerin %5'inde görülen bu tabloya primer TB hastalığı denmektedir.

Tüberkülin cilt testi (TCT), MTB ile oluşan infeksiyonun varlığını göstermede uzun yıllardır kullanılmaktadır. Test, basille karşılaşan kişilerde gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonunun ortaya çıkarılmasına dayanır. Ancak Bacille Calmette Guerin (BCG) aşılmasının yapıldığı durumlar ve TB dışı mikobakterilere maruziyet TCT pozitifliğine neden olabileceği için özgüllüğü azalır.

Günümüzde, LTBI tanısı koymak için kullanılacak TCT'den daha duyarlı, BCG aşısı ve çevresel mikobakteriyel maruziyetinden etkilenmeyen, tüm popülasyonlarda yüksek özgüllük gösterebilen, 'pozitif' olarak yorumlanması için objektif kriterleri olan ve kolay uygulanabilir testlere gerek duyulmaktadır. Son yıllarda bu özelliklere sahip bir test geliştirilmesi için pek çok araştırma yapılmaktadır. Bunlar arasında belki de en önemli ve güncel olanı interferon-gama (IFN- γ) araştırmasına dayanan testlerdir (1).

MTB infeksiyonu ile hücresel bağışıklık yanıtları indüklenmektedir. Bu cevap; makrofajlar, T helper hücreleri ve bu hücreler tarafından salgılanan IFN- γ , tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ile yürütülmektedir. Yeni pek çok araştırma MTB antijenlerine spesifik T-lenfositlerin saptanması temeline dayanmaktadır. Early Secreted Antigenic Target-6 kD (ESAT-6) ve Culture Filtrate Protein-10kD (CFP-10) gibi MTB kompleksi tarafından salgılanan, ancak *M. Bovis*, BCG suşları ve çevresel mikobakteriler tarafından

salgılanmayan antijenlerin kullanılması ile, daha özgül tanı yöntemleri geliştirilebilmiştir. MTB basili ile infekte bireylerin T lenfositleri *in vivo* ortamda ESAT-6 ve CFP-10 antijeni ile tanışmıştır. Aynı bireyin T lenfositleri bu antijenle *ex vivo* ortamda karşılaştığında IFN- γ üreterek yanıt verir (2). Enzim bağımlı immüno-spot assay (ELISPOT) yöntemi, *M. tuberculosis* kompleksine özgül antijenler ile T hücrelerinin uyarılması sonucu salgılanan özgül IFN- γ düzeyinin belirlenmesi ilkesine dayanan IFN- γ bazlı bir serum testidir.

Bugün çalışma amaçlı kullanılan fark 1 bölgesi (region of difference-RD1) tarafından kodlanan antijen karışımlarının kullanıldığı IFN- γ testleri, gelecekte LTBI ve aktif TB'nin tanısında kullanılacak potansiyel testler olarak bildirilmektedir. Bu testlerin, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, çocuklarda, akciğer dışı TB olgularında ve enfeksiyonun endemik olduğu ülkelerde kullanımı ve güvenilirliği ile ilgili bilgiler yetersizdir. Bu konuda yapılacak uzun dönemli çalışmalara gereksinim vardır.

TB enfeksiyonu açısından endemik bir durumda olan ülkemizde TB plörezi, MTB enfeksiyonunun en sık akciğer dışı tutulum bölgesidir. Plevral sıvı mikrobiyolojik analiziyle TB plörezi tanısı koymanın zor olduğu, kesin tanı için pleval biyopsi örneklenmesinin gerekliliği göz önüne alındığında, TB plörezi düşünülen hastaların tanısında pleval biyopsi örneklenmesine göre daha az invaziv, hızlı, duyarlı ve özgül immunolojik tanı yöntemlerinin kullanılabilirliğinin araştırılmasına gereksinim vardır.

Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda, son yıllarda Avrupa ülkelerinde kullanıma girmiş, TCT'ye alternatif olarak geliştirilmiş olan MTB antijenlerine spesifik T lenfositlerin tespit edilmesi esasına dayanan ELISPOT testinin, TB plörezi tanısı konan hastalarda özgüllük ve duyarlılığının araştırılması planlandı. Plevral sıvı, pleval doku kültürü veya histolojik olarak TB plörezi tanısı kesinleşmiş hastaların pleval sıvılarında ve kanlarında ELISPOT yöntemiyle T-SPOT.TB testi çalışarak, testin TB plörezideki tanı değerinin saptanması amaçlandı. Plevral sıvı analiziyle, TB nedeniyle inflame olan pleval boşluğa ESAT-6 ve CFP-10 spesifik T lenfositleri göçünün gösterilmesi ve bunun sonucunda TB plörezinin invaziv girişimlere gerek kalmadan, pleval sıvı analiziyle tanı konulabilirliğinin araştırılması planlandı.

Çalışmadan beklentimiz, TB plörezi tanısında daha güvenilir ve duyarlı olan ELISPOT testinin rutin uygulamadaki değerinin ortaya çıkarılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2007 yılında tüm dünyada 9,27 milyon (139/100.000) yeni vaka ve yaklaşık 1,3 milyon (20/100.000) ölüm bildirilmiştir.

TB, 1993'de DSÖ tarafından 'acil bir global sağlık sorunu' olarak ilan edilen ilk infeksiyon hastalığıdır (3). Tedavi edilebilir ölüm nedenlerinden biri olan TB nedeniyle dünyada her gün 5000 kişi ölmektedir. TB ölümlerinin %98'i gelişmekte olan ülkelerde, genç erişkinlerde meydana gelmektedir. Bu hastalar tanı alana kadar geçen süre içinde, indeks olgu olmaları nedeniyle yakın temaslarında TB basiliyle infeksiyon sorununa yol açabilirler. TB infeksiyonunun uzun bir latent infeksiyon dönemi olması ve TB basiliyle her geçen gün artan sayıda infekte bireyler nedeniyle, TB hastalığına aday bireylerin sayısının gelecekte daha da artması beklenmektedir (2). 2005 Dünya Sağlık Kongresi'nde bildirilen TB kontrolüne yönelik hedef, varolan TB infeksiyonlarının %70'inin tanınması (günümüzde ancak %45'i tanınabilmektedir) ve bu vakaların %85'inin başarıyla tedavi edilmesidir (4).

TB infeksiyonunun toplumda gidişini izlemekte kullanılan en iyi ölçüt 'infeksiyon riskinin yıllık değişimi'dir. Yıllık infeksiyon riski toplumda TB basili ile infekte olmamış kişilerin bir yıl içinde infekte olma olasılığı olarak tanımlanır. Bir toplumda TB'ye karşı mücadele başarı ile yürütülüyorsa her yıl, yıllık infeksiyon riski %10'dan fazla azalacak, eğer mücadele başarısız ise bu azalma %5'den az olacaktır. Ülkemizde hastalık insidansında izlenen bu düşüşe rağmen, 1970'den sonra ulusal TB mücadelesinde bir gerileme görülmektedir. Yıllık infeksiyon riskinde hedeflenen düşüşler izlenmemektedir (5).

Türkiye'de TB gelişme hızı günümüzde yüz binde 30'un altındadır. Fakat hasta bildiriminde yaşanan sorunlar nedeniyle insidansın bu rakamların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de 12-15 milyon bireyin TB basili ile infekte olduğu düşünülmektedir ve her yıl bu havuzdaki insanların %1-3'ünde TB hastalığı gelişmektedir. MTB infeksiyonunun en sık görülen akciğer dışı tutulumu olan TB plörezi insidansı

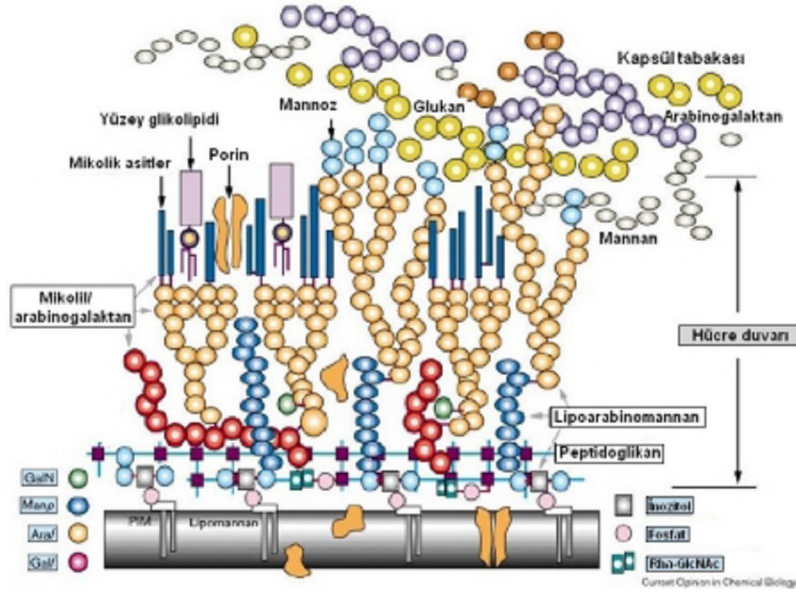
toplumdaki TB insidansı ile benzerlik gösterir. Verem savaşı dispanserlerine 2006'da kayıtlı akciğer dışı TB hastalarına bakıldığında toplam 2560 tane TB plörezi olgusu bildirilmiştir (6). Ülkemizde çoklu ilaç direnci olan TB hastalarının sayısı yüksektir. Bu durum ve veriler ışığında dünya genelinde ve Türkiye'de TB infeksiyonunun daha uzun süre problem olmayı sürdüreceği sanılmaktadır (7). Bu nedenle erken ve doğru tanı, TB kontrolünde ve tedavisinde vazgeçilmezdir (4).

2.2. Tüberküloz Basilinin Genel Özellikleri

TB'ye neden olan mikroorganizma *Actinomycetales* takımı içinde yer alan Mycobacteriaceae ailesinden *Mycobacterium*'dur. Genellikle hücre içi yerleşim gösterip, hücrel immün cevap ve geç tipte hipersensitivite reaksiyonu sonucu granümatöz tipte infeksiyonlara neden olurlar. Benzer biyokimyasal, serolojik, patojenik karakteri olan bakteriler aynı grupta toplanarak kompleks olarak isimlendirilmiştir. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti* "*M. tuberculosis kompleksi*" olarak isimlendirilmektedir. İnsanlarda hastalık oluşturan esas mikobakteri *M. tuberculosis*'tir. Bunların dışında kalan bakterilere atipik mikobakteriler, TB dışı mikobakteriler (NTM) gibi isimler verilmiştir. Atipik mikobakteriler çevrede saprofit olarak bulunurlar.

M. tuberculosis aerop, hareketsiz, spor oluşturmeyen 1-4 µm uzunluğunda ve 0.3-0.6 µm çapında bir bakteridir. İkillenme süresi 15-24 saattir, kültür ortamında üreme süresi ortalama 4-6 haftadır. Gram ve diğer birçok laboratuvar boyası ile boyanmaz. Çünkü mikobakterilerin duvar yapısı diğer bakterilerden farklıdır. Hücre duvarının ana iskeleti peptidoglikan ve arabinogalaktan moleküllerinin fosfodiester bağları ile bağlanmasıyla oluşur. Ayrıca lipoarabinomannan ve fenolik glikolipidler duvar yapısının önemli bir bölümünü oluşturur. Arabinogalaktan ve glikolipid molekülleri arasında mikolik asitler yer alır. Total lipid miktarının %11'i mikolik asit olup hücre duvar kalınlığı ve asit rezistansından sorumludur.

Bu özellik aside dirençli basil (ARB) tanımlamasını ortaya çıkarmıştır. Fakat bu özellik sadece mikobakterilere özgü değildir. *Nocardia* ve bazı *Corynebacterium* türleri de aside dirençli boyanma özelliği göstermektedir (8).



Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvarı.

2.3. Tüberkülozda Bulaşma Yolları

TB’de bulaşma esas olarak solunum yolu ile oluşur. En bulaştırıcı olan hastalar balgam mikroskopisinde ARB pozitif olan akciğer ve larinks tüberkülozlulardır. Sağlam kişiye bulaşma *M. tuberculosis* basilini içeren 1-5 µm boyutlarındaki damlacık çekirdeklerinin solunum yoluyla inhale edilmesi ile olmaktadır.

TB bulaşını etkileyen faktörler şunlardır (9):

1. Kaynak olgunun özellikleri

- Aside dirençli basil pozitif balgam çıkarma miktarı
- Aerosol oluşturma potansiyeli (öksürük, aksırık, konuşma vb)
- TB’nin klinik formu
- TB tedavisi alıp almadığı

2. Çevresel faktörler

- Havalandırma, ultraviyole, güneş ışığı

3. Karşılaşma süresi ve basil yoğunluğu

4. Mikroorganizmanın özellikleri

5. Hedef kişinin özellikleri

- Geçirilmiş TB öyküsü
- Riski arttıran faktörlerin varlığı (HIV pozitifliği, silikozis, kortikosteroid kullanımı, diabetes mellitus vb.)
- BCG aşısı varlığı

2.4. Tüberkülozda İmmün Yanıt ve Patogenez

TB basili ile daha önce hiç karşılaşmamış kişide 1-3 basil içeren damlacık çekirdeğinin inhalasyon yolu ile alt solunum yollarına gelişi ile birlikte basille konakçı arasındaki etkileşim başlamaktadır. Konağın lokal savunma mekanizmalarını geçerek alveoler düzeye kadar ulaşmış bir tüberküloz basilinin neden olduğu olaylar zincirinde aşağıdaki olasılıklar söz konusudur:

- Alveoler makrofajlar inhale edilen basili herhangi bir lezyon oluşturmadan elimine edebilirler.
- Basil başlangıçta çoğalabilir, fakat immün yanıtla birkaç milimetre çapında küçük kazeöz lezyonlar oluşturur ve koruyucu immünite gelişir. Bu durumda klinik ve radyolojik hiçbir bulgu olmaksızın, TCT pozitifleşerek primer infeksiyon oluşur. Az sayıda basil de dorman halde kalarak latent infeksiyonu oluşturabilir.
- İn hale edilen basiller, alveoler makrofajlar içinde çoğalabilirler ve kazeöz bir odak oluştururlar. Oluşan bu kazeöz odak;
 1. İyileşebilir,
 2. Radyolojik bir görüntü vermeden stabilize olarak kalabilir ya da,
 3. Progresyon göstererek, daha büyük odaklar oluşturabilir. Daha büyük kazeöz odaklar da;
 - a) İyileşebilir,
 - b) Stabilize olarak kalabilir ya da,
 - c) Lokal olarak giderek büyür, kan ve lenf dolaşımına karışarak yayılır. Çeşitli patogenetik süreçler sonucunda (gecikmiş tip aşırı duyarlılık ve hücre sel immünite gelişmesi) oluşan büyük kazeöz odaklar likefaksiyona uğrayarak içlerindeki kazeöz materyali ve basilleri bronşiyal ağaca boşaltarak bronş yolu ile yayılıma neden olurlar. Primer TB ya da erken hastalık olarak isimlendirilen tabloyu oluşturur (10).
 - d) Primer infeksiyon sonrası dorman halde kalan basillerin çoğalmaya başlaması ile geç reaktivasyon hastalığı gelişir (11).

Doku hasarı ve kazeöz nekroz oluşumunda çeşitli faktörler rol oynamaktadır (12):

- Sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri (basil yüklü makrofajları öldürürken komşu dokuda da hasar oluşturur)
- Anoksi (makrofajlardan salınan pıhtılaşma faktörlerine bağlı gelişen trombozis

sonucu)

- Toksik hücre ürünleri (reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri, TNF- α vb sitokinler, hidrolitik enzimler, kompleman)
- Toksik basil ürünleri (TB basili toksik değildir, ancak parçalandığında “kord faktör” gibi toksik ürünler ortaya çıkar)

TB hastalığı gelişiminde, doku hasarlayıcı immun yanıt ile makrofaj aktive edici immün yanıt arasında gelişen olaylar rol oynamaktadır. Her iki immün yanıt da T lenfositlerle ilişkilidir. CD4 + T lenfositlerin rol oynadığı hücrel immünite makrofaj aktivasyonunu sağlar. CD8 + T lenfositlerin rol oynadığı gecikmiş tip aşırı duyarlılık ise basil yüklü aktive olmamış makrofajların yıkımından ve kazeöz nekroz oluşumundan sorumludur (13, 14).

M.tuberculosis'e karşı oluşturulan immün yanıtta T lenfositlerle birlikte sitokinler (IFN- γ , IL-12, TNF- α ve IL-6) ve makrofajlar gibi immün bileşenler de rol almaktadır. Makrofajlar anahtar rol oynayan hücrelerdir. Alveollere ulaşan *M. tuberculosis* basili makrofajlar tarafından fagosite edilir. Basil virulan ise makrofaj içinde çoğalır. T lenfositler tarafından salınan IFN- γ makrofajlarda fagozomal matürasyona, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır. IFN- γ makrofajlardaki 1- α hidroksilaz enzimini uyararak aktif D3 vitamininin yapımını artırır. D3 vitamini basillerin makrofaj içi çoğalmasını önlemede yardımcıdır ve bu hücrelerden TNF- α gibi sitokinlerin salınımını artırır. Ortamda bulunan TNF- α da IFN- γ ile sinerjistik etki göstererek granülom oluşumu ve infeksiyonun yayılmasının kontrol altına alınmasında rol oynamaktadır (12). Makrofajlarda TNF- α salınımını arttıran bir faktör de TB basilinin kendisi ve basil duvarında bulunan lipoarabinomannan-B (LAM)'dir.

Tüberküloz basili, bazı özellikleri nedeniyle, makrofajların antibakteriyel mekanizmalarından kaçabilmektedirler. Bunlar;

- Amonyak üretimi: Tüberküloz basili çok büyük miktarda amonyak üretmektedir. Amonyum kloridin lizozomların hareketlerini etkilediği gösterilmiştir. Bu sayede bakteriyel parçalanma için gerekli olan fagozom ve lizozom füzyonunu bloke ederek, lizozom içindeki pH'yı alkali hale getirip reaktif nitrik oksitlerin etkinliğini azaltmaktadır. Böylece basiller lizozomların yarattığı toksik ortamdan etkilenmeden kalabilmektedir.
- Sulfatidler: Mikobakteriler sulfatidler üretmektedir. Bu sulfatidler, lizozom

hareketinde rol alan hidrokolloidlerin oluşumunu engelleyerek yine lizozom-fagozom füzyonunu bloke etmektedir.

- Lipoarabinomannan (LAM) ve fenolik glikolipid I (PGL-I): Mikobakterilerin komponentleri olan bu bileşikler makrofajların antibakteriyel olarak salgıladıkları radikalleri temizleyerek, TB basilinın hasarlanmasını önlerler. LAM ayrıca, toksik oksijen radikallerinin oluşmasında önemli bir enzim olan protein kinaz C'yi de inaktive ederek radikal oluşumu engellemektedir.
- Demir metabolizması: Tüberküloz basilleri bir grup demir bağlayan şelatör moleküle sahiptir. Demir bir çok hücre içi antimikrobiyal aktivite için gereklidir.
- Tüberküloz basilleri, makrofajla bağlanırken Fc reseptörleri gibi oksidatif ürünlerin salınmasını uyaran yollar yerine, bu ürünlerin salınmasına yol açmayan CR1 ve CR3 kompleman reseptörlerini kullanırlar. Bu şekilde de toksik ortamdan korunmuş olurlar (15).

Aktive olan makrofajlar büyür, mitokondri ve lizozomların sayısı ve süperoksit üretimi artar. Yüksek düzeyde biriken litik enzimler ve reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri (özellikle NO) mikrobisidal yeteneği artırır. Fagositoz sonrası birçok sitokin makrofajlardan salgılanır. Bunlardan IL-1, IL-8, TNF- α ve GM-CSF proinflatuar moleküllerdir. Lenfosit ve monositlerin lezyon bölgesinde toplanmasını kolaylaştırır. IL-1, pirojendir ve tüberküloza özgü ateşin oluşumuna katkıda bulunur. IL-6, aktive B lenfositlerden immüglobulin salınımını arttırarak tüberkülozlu hastalarda sıkça görülen hiperglobulinemiye neden olur. TNF- α ise IFN- γ ile birlikte bakterisidal nitrik oksit metabolitlerinin üretimini artırır ve granülom oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca TNF, ateş, kilo kaybı ve tüberküloza özgü doku nekrozları gibi birçok immünopatolojik olaya neden olur. İmmüsupresif etkili IL-10 lenfosit ve monositlerden sitokin salınımını inhibe ederken, transforming growth factor-beta (TGF- β) ise T hücre proliferasyonunu ve makrofaj fonksiyonlarını inhibe eder. Bu iki sitokin kontrol edilemeyen inflamatuvar yanıtta aşırı inflamasyon ve doku nekrozunu önleyebilir (16).

Sitotoksik T lenfositler ve NK hücreleri antikora bağımlı sitotoksik etkileşimler kadar kazeöz nekroz gelişiminde de rol alabilirler. Doku yıkımına pıhtılaşma olayları, makrofajlardan salınan reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri, TNF- α ve TNF- β gibi sitokinler katkıda bulunmaktadır. γ/δ T lenfositler mikobakteriyel antijenlere karşı gelişen erken primer yanıtta etkindirler. Bu hücreler TNF, IL-2, 4, 5, 10 gibi sitokinler üretir ve

infekte hedef hücreleri lizise uğratar. Bu hücrelerin de granülom oluşumuna katkısı olabileceği düşünülmüştür (17, 18).

Canlı basillerden salınan antijenlerin koruyucu immünite gelişiminden sorumlu oldukları ve T lenfositlerin öncelikli hedeflerinin bu antijenler olduğu düşünülmüştür. Otoimmün yanıtın da kazeöz nekroz ve erime gelişiminde katkısı olabilir. Çünkü makrofaj içinde stres altındaki basiller antijenik olarak memeli hücrelerinden salınan proteinlere benzer bir ısı şok proteini (65-kDa hsp) salgılamaktadır. Konakçı immün yanıtı bu antijenik benzerlikten dolayı kendi dokularına yönelebilir.

TB enfeksiyonu sırasında aktive lenfosit topluluğu belirli bir büyüklüğe ulaştınca doku aşırı duyarlılığı veya TCT pozitifliği oluşur (enfeksiyonun başlangıcından 3-9 hafta sonra). Aynı dönemde hücre aracılı immün yanıt da ortaya çıkar.

2.4.1. Patogenezin Evreleri

Evre 1: Başlangıç

Bu evre; infeksiyöz hasta tarafından çıkarılan basil içeren damlacıkların, sağlam kişi tarafından inhale edilip alveollere ulaşması ile patogenetik süreçlerin başlamasını ifade eder. Daha önce de belirtildiği gibi, alveollere ulaşan basiller alveol makrofajlar ya da kan kaynaklı monositler tarafından nonspesifik olarak fagosite edilmektedirler. Makrofajların bakterisidal gücü ve fagosite edilen basilin genetik ve fenotipik virulansına göre, basiller elimine edilebilirler. Virulan bir basil, genetik olarak zayıf bir makrofaj tarafından fagosite edilirse hastalık başlayabilir. Alveoler makrofajların alveole ulaşan çeşitli partikülleri ve damar dışına çıkan eritrositleri fagosite etme yetenekleri bulunmaktadır. Alveole ulaşan TB basili, öncelikle nonspesifik olarak fagosite edilir. Bu kadar az sayıdaki basil antijenik uyarımı başlatacak kadar etkili olamayabilir. Fagosite edilen basiller elimine edilir ve herhangi bir patolojik süreç gelişmeyebilir. TB hastalığı gelişimine karşı direncin genetik kontrol altında olduğu düşünülmektedir. Bazı bireylerdeki alveoler makrofajları daha etkin olabilmektedir. Aynı oranda TB basiline maruz kalan zencilerde, beyazlardan daha fazla tüberkülin konversiyonu olmaktadır. Zencilerdeki alveoler makrofajların TB basiliyi yok etme yeteneğinin daha az olduğu düşünülmektedir (14). Fagosite edilen basiller yok edilemezse bir seri olaylar zinciri başlar.

Evre 2: Basillerin Çoğalma ve Yayılma Evresi

Bu evrede, alveoler makrofaj tarafından fagosite edilen basiller yok edilemezlerse, basiller makrofajın içinde çoğalırlar ve bu süreç makrofajın parçalanmasına yol açar.

Ortama saçılan basiller ve hücre debrisleri, çeşitli konakçı kaynaklı kemotaktik faktörler aracılığıyla kan kaynaklı monositleri ve aktive olmamış makrofajları bu bölgeye çeker. Yeni gelen aktive olmamış makrofajlar ortamdaki basilleri fagosite eder. Burada başrolü oynayanlar, kan kökenli makrofajlardır ve henüz aktive olmamışlardır. Böylece fagosite edilen basiller, makrofaj içinde çoğalmaya devam ederler. Bu evrede ne konakçı basile, ne de basil konakçıya zarar verebilir. Basiller makrofajlar içinde çoğalmaya başlar. Olayın başladığı bölgeye de makrofaj migrasyonu devam eder. İçinde çok sayıda çoğalan basil olan makrofajlar parçalanır, etrafa saçılan basiller diğer makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Bu süreç sırasında çeşitli sitokinler ve kemokinler aracılığı ile dendritik hücreler, monositler, lenfositler ve nötrofiller olay bölgesine toplanırlar. Bu evrede hücrel immün yanıt henüz gelişmemiştir. Bu evre, maruziyetin 7 ile 21. günleri arasında gerçekleşmektedir.

Evre 3: Kazeöz Odak Oluşumu

M. tuberculosis'in inhalasyonundan sonraki 2-6 hafta içinde, etkene karşı özgül hücrel immün yanıt gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı, TCT pozitifliğine ve TB'de görülen kazeifikasyon, likefaksiyon ve kavitasyona neden olur. Konağın bu yanıtı, basil içeren makrofajlar ile çevre dokuları harap ederek, inaktif makrofajlar içindeki basillerin çoğalmasını durdurur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz içeren dokular oluşturur. Makrofaj ve polimorf nüveli lökosit kaynaklı hidrolitik enzimler ile toksik oksijen radikallerinin etkisiyle doku harabiyeti artar. Oluşan kazeöz nekroz ortamında basiller, anoksik koşullar nedeniyle çoğalamazlar, yıllarca hatta yaşam boyu dorman halde kalırlar. Primer infeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) olduğu bu evrede TCT pozitifdir.

Evre 4: Doku Hasarlayıcı ve Makrofaj Aktive Edici İmmün Yanıt

Bu süreç daha önce TB basili ile karşılaşmamış kişilerde, immünsüprese hastalarda, daha önce basille karşılaşmış, immun sistemi sağlam olan kişilerde birbirinden farklı seyretmektedir.

4a (Duyarlı konakçı)

Bu evrede lezyonlar 4-5 haftalık bir sürece erişmişlerdir. Lezyon çevresine sıralanmış aktive olmamış makrofajlar, ortamdaki kaçan basilleri fagosite ederler. Bu

makrofajlar da doku hasarlayıcı immün yanıt tarafından öldürülürler ve kazeöz merkez daha da genişler. Sonuçta, konakçı kendi dokularını yok ederek, basil çoğalmasını durdurmaya çalışmaktadır. Doku yıkımı devam ederken basiller dolaşıma geçerler. Makrofajların bir kısmı aktive olmuştur ve zayıf bir hücrel immünite bulunmaktadır. Basillerin dolaşıma nasıl geçtikleri tam olarak bilinmemekle beraber, birkaç mekanizma düşünülmektedir.

- a) Serbest basiller mediastinal lenfatikler ve duktus torasikus ile sol subklavian ven aracılığı ile sistemik dolaşıma geçebilir.
- b) Primer infeksiyon bölgesinde küçük damarlar ve kapillerlerden doğrudan dolaşıma karışabilir.
- c) Basil fagosite etmiş monositlerin dolaşıma karışması ile hematojen yayılım gerçekleşebilir.

Dolaşıma geçen basiller sonucu gelişen metastatik lezyonlar vücudun her tarafında gelişimlerini sürdürebilirler. Miliyer TB'de bu şekilde bir yayılım söz konusudur. Bu süreçler infantlar, immünsüpre ve AIDS'li hastalarda gelişmektedir.

4b (Dirençli Konak)

Bu durum sağlıklı, immün sisteminde bir bozukluk olmayan hastalarda gelişmektedir. T hücreler ve onların salgıladıkları lenfokinler aracılığı ile hücrel immünite yüksek derecede aktive olmuştur. Bu sayede lezyonun etrafına aktive olmuş makrofajlar dizilmiştir ve kaçan basilleri hızla fagosite edip yok edebilmektedir. Böylece kazeöz odak küçük olarak kalır. Eğer kazeöz nekroz solid olarak kalır ve likefiye olmazsa, hücrel immünite patolojik süreci bu aşamada durdurmuş olur.

Evre 5: Likefaksiyon ve Kavite Oluşumu

Hücrel immünite güçlü olsa bile bazen hastalık progresyon gösterebilir ve kazeöz odak likefiye olur. Likefiye olan materyal, TB basili için oldukça iyi bir ortamdır ve çok yüksek hızlarda çoğalmaya başlar. Bu aşamada, konakçı tüberkülin benzeri maddelere çok duyarlıdır ve ortamda çok sayıda basil olması nedeniyle dokuda toksik reaksiyonlar gelişir. Yakında bulunan bronşta nekroz gelişir ve likefiye materyal bronş yolu ile dış ortama ve akciğerin diğer kısımlarına atılır. Böylece kavite oluşur. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde ve infantlarda likefaksiyon ve kavitasyon olmamaktadır (19).

2.5. Tüberküloz Patolojisi

TB'de gözlenen patolojik değişimler büyük oranda yerel basil antijen konsantrasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesine bağlıdır. Yerel antijen yükünün ya da doku hasarlayıcı immün yanıtın fazla olduğu durumlarda eksüdatif lezyonlar, antijen yükünün ve doku hasarlayıcı yanıtın az olduğu durumlarda proliferatif lezyonlar ortaya çıkar. Çoğu olguda bu iki lezyon tipinin bir arada olduğu karışık lezyonlar daha yaygındır. Yerel antijen yüküne göre lezyonlar ilerleyebilir, tip değiştirebilir, stabil kalabilir hatta gerileyebilir. Tek bir lezyonun bir kısmı ilerlerken diğer bir kısmı gerileyebilir.

Proliferatif veya prodüktif lezyonlar, TB granülasyon dokusu ile karakterizedir. Akciğerlerde lenfohematojen yayılım odaklarında oluşan ilk lezyonların yayılımını önlemek için konakçı tarafından bu lezyonların etrafına inaktif makrofajların toplanmasıyla TB'ye özgü granülomlar (tüberküller) oluşturulur. Böylece lezyonlu bölge sağlam olan komşu dokudan ayrılarak hem basillerin çoğalması hem de yayılması önlenir. Burada merkezde yan yana dizilen makrofajlar ve bunları çevreleyen fibröz doku ve lenfositler bulunur. Zamanla makrofajlar epitelooid hücreye dönüşürken, iki veya daha fazla makrofajın birleşmesiyle Langhans tipi dev hücreler oluşur. Basillerin yok edilme gücüne bağlı olarak granülom merkezinde değişik büyüklükte kazeifikasyon nekrozu gelişebilir (yumuşak tüberkül) veya gelişmeyebilir (sert tüberkül). Tipik bir tüberkül, merkezde bulunan (veya bulunmayan) bir kazeifikasyon alanı, bunu çevreleyen epitelooid hücreler ve Langhans tipi dev hücrelere sahiptir. Daha dışta monosit ve lenfositler, en dışta da fibroblastlar bulunur. Epitelooid hücreler, mononükleer hücreler ve fibroblastlardan oluşan bu üç tabakalı yapıya granülasyon dokusu adı verilir.

Proliferatif lezyonların tipik örneği olan sert tüberküllerde bağ doku hücreleri de yer alır ve bu lezyonlar sıklıkla fibrozis veya skar gelişimi ile iyileşirler. Eğer lezyonlardaki basil yükü ve aşırı duyarlılık reaksiyonu fazla ise, kazeifikasyon nekrozu giderek genişleyecektir. Sonuçta ya genellikle birbirleriyle birleşen küçük, gevşek bir organizasyon gösteren, yumuşak tüberküller ortaya çıkacak (miliyer veya dissemine tüberküloz) ya da küçük ve geniş TB pnömonisi odakları gelişecektir. Oluşan bu eksüdatif lezyonlarda, gevşek bir durumda yerleşmiş lenfositler, makrofajlar ve granülositler görülürken, epitelooid hücreler ve dev hücreler ya seyrek olarak görülecek ya da hiç görülmeyecektir. Bu lezyonlarda yaygın eksüdasyon ve doku nekrozu olacak, eriyen doku nekrozları sonucunda kavite gelişecektir.

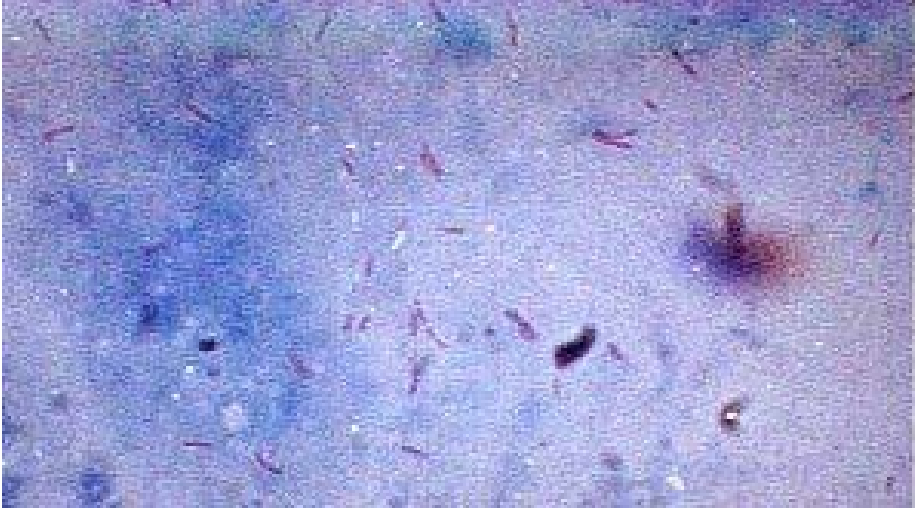
2.6. Tüberküloz Tanı Yöntemleri

2.6.1. Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri

TB'de ön tanı klinik verilere dayanmakla birlikte, kesin tanı laboratuvar yöntemleriyle konmaktadır. Kesin laboratuvar tanı, etkenin hasta örneklerinde gösterilmesi ve izolasyonu ile sağlanır. Etkenin izolasyonu hastalığın tanısı yanında epidemiyolojik değerlendirmeye ve etkenin duyarlılığının belirlenmesine de olanak sağlamaktadır.

TB tanısı için rutin çalışan laboratuvarların yapılanması DSÖ tarafından belirlenmiştir. Üç aşamadan oluşan bu yapılanmanın ilk aşamasındaki laboratuvarlar, hasta örneklerinde sadece mikroskopik inceleme ile ARB varlığını araştırmaktan sorumlu iken, ikinci aşama laboratuvarlarda bu işleme kültür ve *M. tuberculosis kompleks*'in diğer mikobakterilerden ayırt edilmesi eklenmiştir. En üst düzey laboratuvarlar ise diğer laboratuvarların işlemlerine ek olarak, *M. tuberculosis kompleks* dışındaki mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu ve TB ilaçlarına duyarlılıklarının çalışılması ile görevlendirilmiştir (20).

a. Direkt Mikroskopik İnceleme: Mikroskop ile hasta örneğindeki TB basillerinin saptanması, TB hastalığının tanısını koymak için en hızlı, en ucuz ve pratik yöntemdir. Hasta örneklerinden hazırlanan preparatlara, değişik boyama yöntemleri uygulanmakta ve mikroskop ile değerlendirilmektedir. En yaygın kullanılan boyama yöntemi Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemidir. EZN ile boyanmış preparatta en az 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra negatif olduğuna karar verilmelidir. 300 mikroskop alanında saptanan 1-2 basil şüpheli olarak değerlendirilirken 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++), her alanda 10'dan fazla basil görülmesi (++++) olarak yorumlanmalıdır. Kinyoun boyama ve fluorokrom yöntemi ile boyama diğer boyama yöntemleridir. Direk balgam mikroskopisinde en önemli sorunlar yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar ile farklı okuyucuların aynı örnekte farklı sonuçlar bildirmesidir (21).



Şekil 2.2. EZN ile boyanmış preparatta *M.tuberculosis* basilleri

b. Kültür Yöntemleri: TB tanısı için laboratuvara gelen örneklerin bazıları steril örnekler olup bu örneklerin santrifüj edildikten sonra oluşan çökeltisi uygun kültür ortamına aktarılır. Steril olmayan örnekler öncelikle homojenizasyon ve dekontaminasyon aşamalarından geçirilerek (tercihen N asetil L-sistein ve NaOH ile) yine bakterinin yoğunlaşmasını sağlamak amacı ile soğutmalı santrifüjde çöktürme yapılır. Oluşan çökelti mikobakterinin izolasyonunu sağlamak için uygun kültür ortamına aktarılır. DSÖ, mikobakterilerin izolasyonu amacıyla sıvı ve katı özellikte iki ayrı besiyerinin beraber kullanılmasını önermektedir. Sıvı besiyerlerine Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin sıvı besiyeri örnek verilebilir. Katı özellikteki besiyerleri ise yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılabilir. Yumurta bazlı besiyerlerine, Lowenstein-Jensen besiyeri, Petragnani besiyeri ve American Trudeau Society besiyeri, agar bazlı besiyerlerine ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 örnek verilebilir.

Günümüzde, TB basilinin daha hızlı üremesini ve üremenin erken dönemde tespit edilmesini sağlamayı amaçlayan, ‘hızlı sonuç veren kültür sistemleri’ kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerde kullanılan besiyerlerinin içerikleri oldukça zengindir ve mikobakterilerin üreme şansını artırmak amaçlanmaktadır. Hızlı kültür sistemlerinde ağırlıklı olarak sıvı besiyerleri kullanılmakla beraber, bifazik ve katı besiyerlerinin de kullanıldığı sistemler mevcuttur. Bu sistemler arasında; BACTEC 460 TB sistemi (radyometrik esaslı sistem), BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 Sistemi (floresan esaslı sistem), BACTEC 9000 mb Sistemi (floresan esaslı sistem), BacT/ALERT MB (MB/BacT) Sistemi (kolorimetrik esaslı sistem), Dio-TK Scan Kültür Sistemi (katı özellikte kolorimetrik esaslı sistem) dir (22).

Direkt mikroskopik incelemenin pozitif ve kültürde üremenin olmadığı durumlarda;

- Uzamış dekontaminasyon basamağı
- Kültürde kısa inkübasyon
- Yaymaların çapraz-kontaminasyonu
- Su ve kullanılan boyaların aside dirençli mikroorganizmalarla kontaminasyonu
- NTM varlığı düşünülmelidir.

c. İdentifikasyon: Mikobakteri tip belirlenmesi biyokimyasal yöntemlerle ve nükleik asit amplifikasyon teknikleri ile yapılabilmektedir. Kord faktör oluşumu, MacConcey agarda, kanlı agarda üreme testi, NAP (paranitro-alfa-asetilamin-hidroksipropiofenon) testi gibi testlerin yanı sıra katalaz testi, niasin testi, pirazinamidaz testi, thiofen-2 karboksilik asithidraliz testi gibi birçok biyokimyasal test kullanılmaktadır. Bu biyokimyasal testlerin bir arada kullanılması ile sağlanacak identifikasyon oldukça zor ve zaman alıcıdır. Hızlı kültür sistemlerinin çoğunda, mikobakterilerin izolasyonunun yanı sıra, tür düzeyinde tanımlamaları da yapılabilmektedir. BACTEC 460TB'de NAP testi ile *M. tuberculosis kompleks* ve NTM ayırımı yapılabilmektedir (11).

2.6.2. Moleküler Biyolojik Yöntemler

Klasik laboratuvar tanı yöntemlerinden mikroskopinin özgüllük ve duyarlılığının düşük olması, kültür yöntemlerinin ise uzun zaman alması nedeniyle moleküler yöntemler TB laboratuvarlarına çok hızlı bir şekilde girmiş ve farklı uygulama alanları bulmuştur. Moleküler yöntemler klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, tanımlanması, alt tiplene ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılmaktadır.

Tanımda kullanılan moleküler yöntemlerin başında polimeraz zincir reaksiyon (PZR) gelmektedir. Geliştirilen ticari kitlelerle örneklerin işlenmesi, amplifikasyon ve sonuç gözleme işlemleri standardize edilerek laboratuvarlar arası uyumsuzluklar giderilmeye çalışılmıştır. PZR yönteminin ticari olarak üretilmiş şekli (COBAS AMPLICOR PCR) solunum yolu örnekleri için önerilmekte ve genel olarak duyarlılık %66.7-85.2, özgüllük %98.8-99.7 olarak bulunmakta; mikroskopi pozitif olan örneklerde duyarlılık %92.6-96.1'e çıkmakta, negatif olanlarda ise %48-71.7'ye düşmektedir (23-25). Aynı kitin beyin omurilik sıvılarında uygulanması halinde duyarlılık %60 (26), solunum yolu dışındaki diğer örneklerde %61-100 olmaktadır (24).

Solunum yolu örneklerinde kullanılmak üzere üretilmiş diğer bir kit “Gen- Probe Amplified Mycobacterium Direct Test” (Gen-Probe)’tir. Bu testte, hedef molekül olarak her hücrede yaklaşık 2000 kadar bulunabilen rRNA seçilerek, duyarlılığı artırmak hedeflenmiştir. Kültür pozitif solunum yolu örneklerinde yöntemin duyarlılığı %91-98.4 iken, özgüllük %98.5-98.9 olarak saptanmıştır (27, 28). Solunum yolu dışındaki örneklerde duyarlılık %20-100, özgüllük %95-96.4 olarak belirlenmiştir (27).

Diğer bir moleküler yöntem olan zincir ayrıştırma amplifikasyon (strand displacement amplification=SDA) ile solunum yolu örneklerinden tüberküloz basillerinin araştırılmasında; kültür ve mikroskopi pozitif örneklerin tamamından pozitif sonuç alınmış, testin özgüllüğü %85-94 arasında bulunmuştur (29). Yöntemin bir versiyonu olan “BDProbeTec-SDA” ile kültür pozitif örneklerin %94.7’sinden pozitif sonuç alınırken, özgüllük %99.8 olarak saptanmıştır (30).

TB’nin tanısında alternatif bir DNA amplifikasyon yöntemi olan Ligaz zincir reaksiyon (Ligase chain reaction=LCR) ticari kit halinde üretilmiştir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda; klinik örnekler göre değişmekle birlikte duyarlılık %84-97.5, özgüllük %95.8-100 olarak bulunmaktadır (31-33).

TB laboratuvarlarında fazla sayıda değişik moleküler tanı yöntemleri denenmiş olmakla birlikte, bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi konvansiyonel yöntemlerin yerini alamamışlardır. Bunun nedenleri; amplifikasyona dayalı yöntemlerin genel pozitiflik oranlarının ve duyarlılığının kültürden anlamlı derecede yüksek olmayışı, ampikon veya pozitif klinik örneklerin birbirine karışmasına bağlı olarak hatalı pozitiflikler görülebilmesi, her klinik örnek için kullanılacak, standardize edilmiş ticari kitin henüz bulunmayışı, tedavi görmüş olan hastalarda, klinik örnekte ölü basil varlığında bile DNA yöntemleriyle pozitif sonuç alınabilmesidir.

2.7. LTBI Tanısı

TB ile mücadelede en önemli basamak, LTBI’nın tanınması, tedavi edilmesidir. TB basili vücuda girdikten sonra aylarca-yıllarca hastalık oluşturmadan kalabilir. Bu dönemde vücut tarafından oluşturulan savunma yanıtları, basillerin aktivite göstermeden canlılıklarını sürdürmelerini sağlar. Buna “TB infeksiyonu” denir. LTBI tedavisi ile aktif TB gelişimi büyük ölçüde önlenmektedir. Esas problem LTBI bulunan bireylerin saptanmasıdır (2). İsoniazid ile 6-9 ay süreyle yapılan LTBI tedavisinin etkinliği %25 ile %92 arasında değişmektedir. Tedavi uyumunun iyi olduğu bireylerde koruyucu etkinlik genellikle %90 düzeyindedir (34). *M. tuberculosis* basiline karşı hücrel immünite

gelişimi genellikle TCT pozitifliğine neden olmaktadır. Günümüzde *M. tuberculosis* ile infekte bireylerin taranması TCT ile yapılmaktadır (35).

2.7.1. Tüberkülin Cilt Testi

M. tuberculosis infeksiyonunun belirlenmesinde en yaygın kullanılan testtir. Mikroorganizmanın bazı antijenik bileşenlerine karşı oluşan gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunu belirler (36). TCT'nin uygulanmasında kullanılan standart test metodu Mantoux yöntemidir. TCT hem güvenli hem de gebelik döneminde kullanılabilen bir testtir. Mantoux deri testi intradermal olarak 0.1 ml PPD'nin ön kolun iç yüzeyine uygulanması ile yapılır. Enjeksiyon tek kullanımlık tüberkülin enjektörü ile yapılmalıdır ve iğnenin açıklığı yukarı bakacak şekilde deri içine girilmelidir. Uygulama sonrasında deride yuvarlak, keskin sınırlı, soluk 6-10 mm çapında mercimek büyüklüğünde kabarıklık oluşmalıdır. Bu, testin doğru yapıldığını gösterir. Eğer test doğru olarak uygulanmamış ise ilk yerden birkaç cm uzağa tekrar uygulanmalıdır. Deri testi eğitimli sağlık çalışanları tarafından 48-72 saat sonrasında değerlendirilmelidir. Eğer 48-72 saat içinde deri testi değerlendirilemezse, pozitif reaksiyonlar 1 hafta içerisinde değerlendirilebilir, negatif sonuçlar için tekrar test yapılması gerekir (37).



Şekil 2.3. Mantoux deri testi

a) TCT Değerlendirilmesi

BCG skarı olmayan bireyler:

0-5 mm ise: Negatif olarak kabul edilir.

6-9 mm ise: Şüpheli kabul edilir, 1 hafta sonra test tekrarlanır, yine 6-9 mm bulunursa negatif kabul edilir; 10 mm ve üzeri pozitif kabul edilir.

10 mm ve üzeri: Pozitif kabul edilir.

Bağışıklığı baskılanmış kişilerde 5 mm ve üzeri pozitif kabul edilir.

BCG skarı bulunan bireyler:

0-5 mm: Negatif kabul edilir.

6-14 mm: BCG'ye bağlı kabul edilir.

15 mm ve üzeri: Pozitif kabul edilir, infeksiyon olarak değerlendirilir.

TCT'nin yalancı pozitif reaksiyon verdiği durumlar

Yalancı pozitif yanıt genellikle PPD antijeni ile paylaşılan diğer mikobakteri antijenlerinden kaynaklanmaktadır. Bu da NTM ile infeksiyona bağlı çapraz reaksiyon veya BCG aşılamasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (38). Bu apraz reaksiyonların hangi mikobakteri türüne bağlı olduğunun ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Bunun yanında endürasyon çapı ne kadar büyükse bunun *M. tuberculosis*'e bağlı olma olasılığı da o kadar yüksektir. Aynı şekilde BCG aşısına bağlı çapraz reaksiyonun ayırt edilebilmesi de zordur.

Şu durumlarda reaksiyonun *M. tuberculosis* infeksiyonuna bağlı olabileceği düşünölmektedir (39):

- Endürasyon çapının büyük olması
- TB'li birey ile temasın olması
- Ailede TB hastalığı öyküsü olması veya ölkede TB infeksiyonu prevalansının yüksek olması
- Aşı ile test arasında uzun bir süre olması

Aşıya bağlı tüberkülin yanıtı zamanla azalma gösterir ve 10 yıldan daha uzun sürmesi beklenmez (39). BCG ile aşılanmış ocuklarda TCT yanıtları 3 mm ile 19 mm arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Aşı sonrasında oluşan TCT reaksiyonu aşının koruyuculuğunu göstermez (40) ve BCG aşısından sonra geçen süreye bağlı olarak tüberkülin yanıtında azalma görölebilir.

Tüberkülin cilt testinin yalancı negatif reaksiyon verdiği durumlar:

1. Test edilen bireye bağlı faktörler

- İnfeksiyonlar
 - a) Viral (kızamık, kabakulak, suçiçeği, HIV)
 - b) Bakteriyel (tifo, brusella, lepra, boğmaca, yaygın TB, TB plörezi)
 - c) Fungal (Güney Afrika blastomikozu)
- Canlı virüs ile aşılanma (kızamık, kabakulak, polio, su ieği)
- Metabolik dengesizlikler (kronik böbrek hastalığı)
- Düşük protein durumları (afibrinojenemi, ciddi protein kayıpları)

- Lenfoid organları etkileyen hastalıklar (Hodgkin hastalığı, lenfoma, kronik lösemi, sarkoidoz)
 - İlaçlar (kortikosteroidler, immünosupresif ilaçlar)
 - Yaş (yenidoğanlar, yaşlılar)
 - Stres (cerrahi, yanık, mental hastalıklar, graft-versus-host hastalığı)
2. Kullanılan tüberküline bağılı olarak
- Uygun olmayan depolama (ısı ve ışığa maruz kalma)
 - Uygun olmayan sulandırma
 - Kimyasal denatürasyon
 - Kontaminasyon
 - Enjektör tarafından emilme
3. Uygulama metoduna bağılı olarak
- Düşük doz antijenin enjekte edilmesi
 - Cilt altına enjeksiyon
 - Enjektörde fazla bekletilmiş antijen enjeksiyonu
 - Diğer deri testlerinin çok yakınına enjeksiyon yapılması
4. Testin değerlendirilmesine bağılı
- Deneyimsiz kişilerce testin değerlendirilmesi
 - Kayıt sırasında hatalar

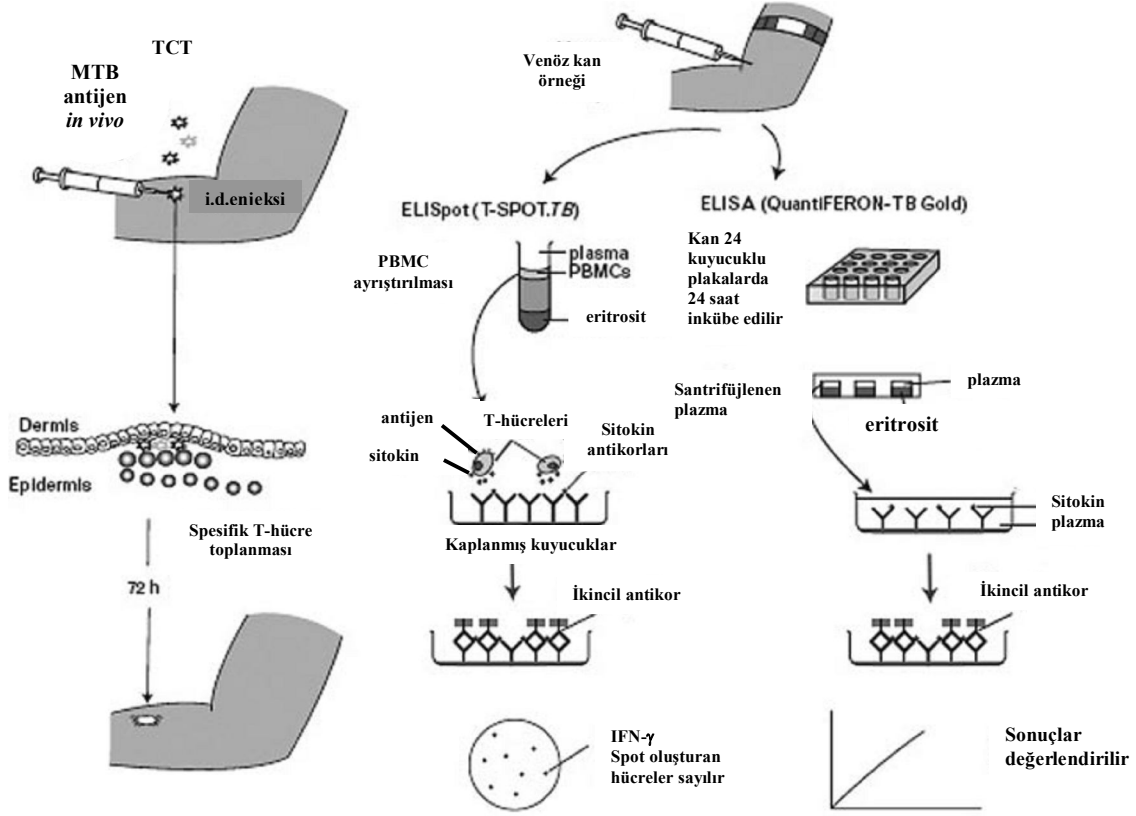
TB basili ile infekte olan bazı bireylerde gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu yıllar içinde giderek azalabilir. Bu bireyler infeksiyondan yıllar sonra tekrar test edildiklerinde negatif yanıt verebilirler. Fakat TCT 1-3 hafta sonra tekrarlandığında tip 4 aşırı duyarlılık reaksiyonunu uyarabilir (booster fenomeni). Bu etki her yaş grubunda görülebilir, insidansı yaş arttıkça artar ve yaşlılarda daha sık görülür. Booster etkisi NTM ile infekte olmuş bireylerde veya BCG aşısı ile aşılanmış bireylerde de görülebilir. İki aşamalı TCT, booster etkisini ortadan kaldırmak için yapılır. Eğer yapılan ilk deri testi negatif olarak değerlendirilmiş ise, ikinci test 1 hafta sonrasında yapılmalıdır. İkinci teste alınan pozitif yanıt olasılıkla “booster” yanıtıdır (eski infeksiyon veya BCG aşılama). Bu test sonucuna göre bireyin daha önceden infekte olduğu kabul edilmeli ve ona göre değerlendirilmelidir. Bu sonuç, test konversiyonu olarak değerlendirilmemelidir. Eğer ikinci test sonucu negatif ise birey infekte olmamış anlamına gelir. Bu bireyde takip eden

diğer testler pozitif olarak ortaya çıkarsa deri testi konversiyonu olarak kabul edilir ve yeni bir infeksiyonu gösterebilir (41).

2.7.2. Serum Interferon- γ Testleri

TCT bir çok durumda yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuç verebilmekte ve testin TB infeksiyonu için prediktif değeri, incelenen popülasyonun infeksiyon prevalansı, BCG aşılması ve NTM infeksiyonu prevalansına göre değişkenlik göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı TCT'den daha duyarlı ve özgül olan, sayılan nedenlerden etkilenmeyen daha güvenilir testlere ihtiyaç vardır. Son yıllarda *M. bovis*, BCG suşları ve birçok NTM'de bulunmayan, sadece *M. tuberculosis* genomunda yer alan RD1 gen segmentinin saptanması ve bu gen segmenti ürünlerine özgül immün yanıtların ölçülebiliyor olması, TB infeksiyonunun saptanmasında yeni bir testin geliştirilebileceği fikrini doğurmuştur (42). Bu nedenle günümüzde bu özelliklere sahip bir test geliştirilmesi için pek çok araştırma yapılmaktadır. Bunlar arasında belki de en önemli ve güncel olanı interferon-gama (IFN- γ) araştırmasına dayanan testlerdir (2).

Bu testlerde, ELISA ve ELISPOT yöntemleri kullanılmaktadır. Bu testler *M. tuberculosis*'e spesifik antijenler olan ESAT-6, CFP-10 ve antijen 7.7 (RV2645) ile stimülasyona yanıt olarak mononükleer hücreler tarafından salgılanan IFN- γ tespitine dayalıdır. Bu antijenleri kodlayan genler, *M. bovis* BCG suşları ve NTM'lerin çoğunda (*M.kansasii*, *M. marinum* ve *M. szulgari* hariç) bulunmamaktadır. Bu nedenle, testin teorik olarak BCG aşısı ile çarpaz reaksiyon vermeyeceği düşünülmektedir (43).



Şekil 2.4. TST, T-SPOT.TB ve ELISA çalışma prensipleri (44)

Son 10 yılda yapılan araştırmalarla dört ticari IFN- γ araştırmasına dayanan test geliştirilmiştir (42):

1. QuantiFERON-TB assay (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia),
2. T SPOT-TB assay (Oxford Immunotec, Oxford, UK),
3. QuantiFERON-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia),
4. QuantiFERON-TB Gold (In-Tube metod).

Her dört test de, TB antijenleri ile uyarıya yanıt olarak T hücrelerinden salınan IFN- γ 'yı ölçerek hücre aracılı bağışıklığı değerlendirmektedir. Bu testlerde, ELISA ve ELISPOT yöntemleri kullanılmaktadır.

Tablo 2.1 T hücrelerinde IFN- γ araştırmasına dayanan testler ve özellikleri (45)

	T hücre kaynağı	İnkübasyon periyodu (saat)	Stimulan antijenler	Çalışma yöntemi
QuantiFERON-TB	Tam kan	24-48	PPD	ELISA
T SPOT-TB	Periferik kan mononükleer hücreleri	16-24	ESAT-6, CFP-10	ELISPOT
QuantiFERON-TB Gold	Tam kan	16-24	ESAT-6, CFP-10	ELISA
QuantiFERON-TB Gold (In Tube Metod)	Tam kan	16-24	ESAT-6, CFP-10, Antijen 7.7	ELISA

Tablo 2.2 TCT ve IFN- γ araştırmasına dayanan testlerin performans ve işlevsel özellikleri (46)

Performans ve araştırmasına işlevsel özellikler	TCT	IFN-γ araştırmasına dayanan testleri
Duyarlılık	%75-90	%80-95
Özgüllük	%70-95	%95-100
BCG ile çapraz reaksiyon	Var	Daha az
NTM'ler ile çapraz reaksiyon	Var	Daha az
Test pozitifliği ile izlem sürecinde aktif TB gelişim riski ilişkisi	Orta-güçlü ilişki	Yetersiz veri
TB ile temas ilişkisi	Var	Var
Güvenilirlik	Var	Kanıt yok
Booster etkisi	Var	Yok
Yan etki	Nadir	Nadir
Hasta viziti	İki	Bir
Maliyet	Düşük	Yüksek
Laboratuvar alt yapısı	Gerekmez	Gerekli
Testin sonuçlanma hızı	2-3 gün	1-2 gün
Personel ihtiyacı	Var	Var

RD1-temelli IFN- γ araştırmasına dayalı testlerin, PPD-temelli testlere oranla daha özgül oldukları düşünülmektedir (42, 46). Başlangıçta bu konuda yapılan araştırmalar

büyük ölçüde latent tüberkülozun tanısına odaklandıysa da günümüzde bu testlerin birçok uygulama alanı vardır. Bunlar (45);

- Aktif tüberkülozun tanısı,
- Aktif tüberkülozun öngörülebilmesi,
- *M. tuberculosis* infeksiyonu ile önceden yapılmış BCG aşısı arasındaki ayrımın yapılması,
- LTBI olanlarda aktivasyonun öngörülebilmesi,
- Tedaviye yanıtın izlenmesi

Özgül RD1 antijenleri kullanan IFN- γ araştırmasına dayanan testlerin daha yüksek özgüllük, *M. tuberculosis* teması ile daha iyi ilişki, önceki BCG aşısı ve NTM ile göreceli daha düşük çapraz reaksiyon gösterme gibi TCT'ye oranla bazı üstünlükleri olabilir. Antijen karışımları kullanan IFN- γ araştırmasına dayalı testler, özgüllük ve duyarlılık açısından en iyi bileşenler gibi görünmektedir. Bu durum klinik olarak, TB infeksiyonu için duyarlı olan bu yeni testlerin, özellikle yanlış negatif TCT sonuçlarına eğilimli gruplara (bağışıklığı baskılanmış bireyler, çocuklar, akciğer dışı tüberküloz olguları, malnütrisyonlu hastalar) tanı koymaya yardımcı olacağı anlamına gelir. IFN- γ araştırmasına dayalı testler yanlış pozitif sonuçları azaltarak gereksiz tedavileri ve yan etkileri azaltabilir (42). Ancak bu konu ile ilgili veriler yetersizdir. Bu dönemde yapılacak uzun dönemli ve iyi planlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

ELISPOT tek hücre düzeyinde, hücre aktivasyonunu değerlendiren yüksek duyarlılığa sahip ve basit bir tetkiktir. Antijen ve peptidlere özgün bağışıklık yanıtının ölçülmesi için kullanılır. Tüm hastalardan 20 ml venöz kan örneği alınır ve periferik kan mononükleer hücreler ayrılır. Bu tetkik için 96 kuyucuklu monoklonal anti-IFN- γ antikoru ile kaplanmış plakalar kullanılmaktadır. Her kuyucuğa 2×10^5 hücre ekilir. İki kuyucuğa ESAT-6 ve CFP-10 proteinleri eklenir, bir kuyucuğa antijen özgün olmayan fitohemaglutinin eklenerek pozitif kontrol, bir kuyucuğa da antijen eklenmeyerek negatif kontrol oluşturulur. Bir gece 37°C 'de %5 CO_2 ile inkübe edilir, böylece T hücrelerinin antijeni tanımları sağlanır. Daha sonra plakalar yıkanarak antijenler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimle konjuge sekonder antikor ve daha sonra kromojenik substrat eklenir. ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerine spesifik T lenfositlerin oluşturduğu siyah noktalar, bir mikroskop veya bir büyüteç aracılığıyla sayılır. Negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırılarak, test sonucu değerlendirilir.

2.8. Tüberküloz Plörezi

TB plörezi, MTB infeksiyonunun en sık görülen ekstrapulmoner tutulumudur. Tüm TB vakalarının ortalama %37.4'ünde bulunur (47). Ülkemizin pek çok yerinde eksüdatif plörezinin sebepleri arasında TB ilk sırada yer alır.

2.8.1. Patogenez

TB plörezi, sıklıkla primer infeksiyonun erken bir komplikasyonu olarak gelişebileceği gibi, postprimer TB'nin ilerlemesi şeklinde de gelişebilir. TB basilinin pleural aralığa ulaşması, primer infeksiyon sırasında lenfo-hemotojen yayılım, akciğer TB'nin seyri esnasında lokal lenf bezlerindeki basillerin geri akımla plevraya ulaşması, bronko-plevral fistül veya pnömotoraks komplikasyonu şeklinde doğrudan yolla olabileceği gibi, daha sıklıkla akciğer parankimindeki subplevral yerleşimli kazeöz odağın rüptürü ile TB antijenlerinin pleural boşluğa ulaşması ve bunun sonucunda duyarlı CD4 + T-lenfositler tarafından yönetilen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu ortaya çıkar (49). Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olarak plevradaki kapillerin permeabilitesinde artış olduğu ve bu durumun plevrada sıvı toplanmasına neden olduğu ileri sürülmektedir. TB plörezinin gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olduğunu destekleyen en önemli bulgu plevra sıvı kültüründe çok az hastada basil üretilmesidir (49).

Plevral boşluğa yayılan mikobakteri antijenlerine ilk yanıt veren hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller, mononükleer hücrelerin pleural boşluğa göç etmelerine neden olur. Sıvıda 2-5. günler arasında baskın hücreler makrofajlardır. İnflamasyonun 3. gününden itibaren lenfositler görülmeye başlar. Lenfositlerin çoğu CD4 + T-lenfositlerdir. Plevral sıvıda mikobakteri ve mikobakteri antijenlerini fagosite eden makrofajlar, bu antijenleri hücre membranlarında MHC II antijeni ile CD4 + T-lenfositlere sunarlar ve IL-1 ile IL-2 salgılayarak T- lenfositleri stimüle ederler. Aktive T lenfositler de başlıca IFN- γ olmak üzere sitokinler salgılayarak makrofajların mikobakteri öldürme kapasitelerini artırır. Plevra boşluğundaki mikobakteri antijenlerinin duyarlı T-lenfositleri ile karşılaşması gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ve sıvı toplanması ile sonuçlanır (43, 49).

2.8.2 Klinik Bulgular ve Tanı

TB plörezi, başlangıçta kendi kendine sınırlı bir hastalık olmasına rağmen, tedavi edilmeyen hastaların %65'inde 5 yıl içinde aktif pulmoner veya ekstrapulmoner TB geliştiği bildirilmiştir (50). Semptomlar çoğunlukla yavaş başlar. Klasik TB semptomları (ateş, gece terlemesi, iştahsızlık, halsizlik, zayıflama) yanında plöritik ağrı, kuru öksürük (produktif de olabilir), nefes darlığı da görülebilir. Parankimal tutulum direk grafilere yansıyandan çoktur. Toraks BT'de %50, patolojik çalışmalarda %80 akciğer parankiminin de tutulduğu bildirilmektedir.

TB plözide sıvı, saman sarısı renginde, berrak veya hafif bulanık olur. Daima eksüdadır. Glukozun düşük olduğu görülse de çoğunlukla 60 mg/dl'nin üzerindedir. Basilin plevraya ulaşmasıyla oluşan ilk yanıt nötrofillerden gelir. Bu nedenle başlangıçta sıvıda polimorf nüveli lökositler artmış bulunabilir. Üçüncü günden itibaren hakim hücre lenfositlerdir. Bu sebeple şüpheli durumda torasentezin yinelenmesi önerilir.

TCT'nin pozitif olması eksüdatif plevral efüzyonlu hastada tanıyı destekler, negatif olması ise tanıyı ekarte ettiremez. TB plözisi olan hastaların yaklaşık %30 'unda test negatif çıkabilir. Bu hastalarda TCT negatifliği kanda bulunan supresör hücrelerin T lenfositlerin aktivitesini baskılaması ile açıklanmaktadır. Ancak TCT negatif olan bazı hastaların kanında supresör hücrelerin varlığı gösterilememiştir. Bu durumda TCT negatifliğinin CD4 + T lenfositlerin plevral sıvıda toplanması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (49).

Adenozin deaminaz (ADA), adenozinin inozine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Aktive lenfositler, makrofajlar ve nötrofillerden salgılanan bir nonspesifik inflamasyon belirteçidir. TB plözilerinde düzeyi artmaktadır (51). Plevral sıvı ADA düzeyi 40 U/L'nin altındaysa TB plörezi tanısından uzaklaşılırken, ADA düzeyi 70 U/L'nin üstünyse öncelikle TB düşünülmesi gerektiği bildirilmektedir (52). TB prevalansı yüksek olan ülkelerde, 35 yaş altı kişilerde ADA düzeyi 47 U/L'nin üzerinyse plevra biyopsisine gerek olmadığı, ancak ADA düzeyi 47 U/L'nin altındaysa plevra biyopsisi yapılması gerektiği belirtilmektedir (6). ADA'nın ADA 1 ve ADA 2 olmak üzere iki izoenzimi mevcuttur ve plevral sıvıda ADA izoenzim düzeylerinin belirlenmesi ile ADA'nın tanısal değerinin artabileceği bildirilmektedir. ADA1 en fazla lenfosit ve monositlerde olmak üzere tüm hücrelerde bulunurken, ADA 2 esas olarak monosit ve makrofaj aktivasyonunu gösterir. TB plözide ADA 2 artarken, bazı malign sıvılar, ampiyem ve parapnömonik sıvılarda ADA 1 artmaktadır (43).

Hem çabuk, hem de kesin tanıyı koyduracak bir tetkik olan plevral sıvıda ARB aranması ihmal edilmemelidir. Ancak çok az sayıda pozitif sonuç verir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda plevral sıvıda %2-10 düzeylerinde basil saptanabildiği gösterilmiştir (48). Plevral sıvıda çalışılan MTB kültürü pozitifliği ise %12-70 arasındadır. MTB kültürü için kapalı biyopsi ile alınan plevral biyopsi kültürünün sensitivitesi %39-80, histopatolojik olarak kazeifiye granülomların gösterilmesinin sensitivitesi %50-97 olarak saptanmıştır (50). Sonuç olarak plevral sıvının tetkikleriyle kesin tanıya ulaşmanın zor olduğu, plevral dokunun histopatolojik incelemesinin daha yüksek tanı değeri olduğu gözlenmektedir.

Medikal torakoskopi (plöroskopi), plevra sıvı incelemesi ve yapılmış ise kapalı plevral biyopsi ile tanıya ulaşılamadığı durumlarda endikedir. Plevral efüzyonların yaklaşık beşte birinde torakoskopi endikasyonu vardır. TB plörezide plevranın en yoğun hastalık tutulumunun olduğu yerlerin plöroskopi ile görülüp, yeterli doku örneklerinin alınmasıyla %100 histopatolojik tanı, %78 MTB kültür pozitifliği tanısı elde edilmektedir. Diğer yöntemlerle nedeni aydınlatılamayan eksudatif plörezide plöroskopi bugün kabul edilen kesin tanı yöntemidir (51). Göreceli olarak invaziv bir işlem olmasına karşın oldukça güvenli ve tanı oranı yüksek bir girişimsel yöntemdir. İşlemin tek kesin kontrendikasyonu plevral boşluğun olmamasıdır. Plöroskopi yapılabilmesi için plevra yaprakları arasında 6-10 cm'lik bir boşluğa ihtiyaç vardır. Eğer hastanın plevral efüzyonu yoksa bir gün önce yapay pnömotoraks oluşturularak plöroskopi yapılabilir. Diğer kontrendikasyonlar hastanın genel durumunun kötü olması, kardiyovasküler bulguların dengesiz olması, plevral efüzyona bağlı olmayan hipoksemi, ateş, kontrol edilemeyen öksürük ve düzeltilememiş kanama diyatezidir. Sıralanan bu sakıncalı durumlar diğer invaziv işlemler için de geçerli olup, plöroskopiye özgü kısıtlamalar değildir. İşlem öncesi solunum fonksiyon testleri, arter kan gazları, EKG, tam kan sayımı ve kanama tesleri ile hasta değerlendirilmelidir. Torakoskopi için en uygun giriş yerini saptamak üzere en yakın tarihli direkt akciğer grafi ve toraks bilgisayarlı tomografisi işlemden önce incelenmelidir (53).

Son yıllarda LTBI tanısında T lenfosit kaynaklı IFN- γ araştırmasına dayalı in vitro bazı testler geliştirilmiştir. Bu testler TB antijenleri ile uyarıya yanıt olarak T lenfositlerden salınan IFN- γ 'yı ölçerek hücre aracılı bağışıklık yanıtını değerlendirmektedir. Normalde bu testler periferik kan mononükleer hücreleri kullanılarak yapılırken, plevral sıvı mononükleer hücreleri de kullanılabilir (43). Losi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada klinik olarak TB plörezi düşünülen 20 hasta ve tüberküloz dışı tanı 21 hastada periferik kan mononükleer hücrelerinde T-SPOT.TB testi

değerlendirilmiş ve testin sensitivitesinin periferik kan için %90, plevra sıvısı için %95, spesifitesinin periferik kan için %67, plevra sıvısı için %76 olduğu saptanmıştır (54).

Eksüdatif plevral efüzyonu olan, klinik olarak TB plöziden şüphelenilen hastalarda kesin tanıya ulaşabilmek için plevral sıvı analizi yanında, plevra biyopsisine de sıklıkla gerek duyulmaktadır. Plevral biyopsinin invaziv bir işlem olduğu göz önünde bulundurulduğunda kesin TB plörezi tanısını koyabilmek için daha az invaziv, hızlı, duyarlı ve özgül immunolojik tanı yöntemlerinin kullanılabilirliğini araştırmak gereklidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) Araştırma ve Geliştirme Projesi Destekleme Programı kapsamında (Projesi No: 108S117), Başkent Üniversitesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür.

KA07/199 no'lu projenin 10 Ocak 2008 tarihinde Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Etik Kurulu onayları alınmıştır. Çalışmada planlanan olgu sayısına ulaşabilmek amacıyla referans bir merkezden de olgu elde etmemiz gerekmektedir. Bu nedenle Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurul onayları da aynı tarihlerde alınmıştır.

Çalışma amacı, TB plörezi tanısında T-SPOT.TB testinin kullanılabilirliği ve tanısal değerinin tüberkülozun endemik görüldüğü, BCG aşılmasının rutin yapıldığı ülkemizde araştırılmasıdır. Diğer tanı yöntemleriyle kesin TB plörezi tanısı konmuş referans hasta gruplarında, T-SPOT.TB testinin yüksek tanısal değerinin saptanması ve diğer tanısal testlerle ELISPOT yönteminin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Plevral efüzyonun yanı sıra, serumda da ELISPOT testinin çalışılması ile ESAT-6 ve CFP-10 spesifik T lenfositlerin inflame dokuya göçünün gösterilmesi planlanmıştır. Böylece, plevral sıvıda ARB basili saptanamayan TB plörezili hastalarda, kültürlerin sonuçlanması için gereken uzun süre beklenmeden, plevral biyopsiye gerek kalmadan, alternatif ve hızlı bir tanı yönteminin rutin kullanılabilirliği ve algoritmalarındaki tanısal değerinin belirlenebileceği öngörülmüştür.

Kasım 2008 ve Mayıs 2009 tarihleri arasındaki 6 aylık dönemde, kesin TB plörezi tanısı konmuş hastalar ile kontrol grubu olarak kalp yetmezliğine bağlı transüdatif plevral efüzyonu olan hastalar araştırmaya dahil edildi. Tüm katılımcılardan yazılı onam formu alındı.

Klinik bulgularla kalp yetmezliği tanısı konan, transüdatif efüzyonlu 20 hasta (grup I), mikrobiyolojik veya histopatolojik olarak TB plörezi tanısı teyit edilen ve TB tedavisinin ilk ayı içerisinde bulunan 10 hasta (grup II) çalışmaya alındı.

Araştırmaya dahil edilen tüm hastaların detaylı tıbbi öyküleri alındı, BCG aşı durumları sorgulandı, direkt akciğer grafileri değerlendirildi. Plevral efüzyon örneklerinden ADA gönderildi. TB plörezi tanısı olan bireylerin 3 kez balgam ARB yaymaları değerlendirildi. Tüm olgulara TCT yapıldı. Serum T-SPOT.TB testi için 8 cc

venöz kan örneği, plevral sıvı T-SPOT.*TB* testi için yaklaşık 20 cc plevral sıvı örneği alındı.

3.1. TCT

Tüberkülin cilt testi için 5 IU PPD (Tuberculin PPD RT 23 SSI, Statens Serum Institut, Denmark, 5 PPD- S tüberkülin aktivitesinde) kullanıldı. PPD tüm olguların kollarının iç yüzeyine intradermal olarak yapıldı ve test 48–72 saat sonra TCT konusunda deneyimli bir hekim tarafından değerlendirildi. TCT sonuçları, “Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı TCT Yorumlama Kriterleri” baz alınarak yorumlandı (55).

3.2. Torasentez

Torasentez öncesi yapılacak işlem hastaya anlatıldı ve yazılı onam formu alındı. Hasta işlem masasının kenarında sırtı hekime dönük olarak dik oturtuldu. Sıvının yerleşimi taktik fremitusun kaybolduğu, perküsyon ile matite alındığı düzey olarak belirlendi. Torasentezin bu düzeyin bir altındaki interkostal aralıktan, vertebral çizginin 5-10 cm lateralinden yapılması planlandı. Girişim yeri belirlendikten sonra seçilen alan ve çevresi geniş olarak antiseptik solüsyon ile temizlendi. İnterkostal damarlar ve sinirlerin yaralanma olasılığını en aza indirmek için belirlenen interkostal aralığın alt sınırını oluşturan kostanın üst kenarından ponksiyon yapıldı. T-SPOT.*TB* testi için yaklaşık 20 cc plevral sıvı alındı.

3.3. T.SPOT-*TB*

3.3.1. Gerekli Malzeme ve Gereçler

Ticari Kitin Sağladıkları (T-SPOT.*TB* (Oxford Immunotec, Oxford, UK))

1. Anti-IFN- γ monoklonal antikoları ile kaplı 96 kuyucuktan oluşan T-SPOT.*TB* plakları
2. CFP-10 antijeni (Panel A)
3. ESAT-6 antijeni (Panel B)
4. Pozitif kontrol için Phitohemaglutinin (PHA)
5. Alkaline-phosphatase ile konjuge edilmiş konjugat solüsyonu
6. Substrat solüsyonu (BCIP/NBT^{plus})



Şekil 3.1. Anti-IFN- γ monoklonal antikorları ile kaplı 96 kuyucuktan oluşan test plağı, ESAT-6 ve CFP-10 antijen solusyonları, pozitif kontroller için PHA solusyonu. T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK)

3.3.2. Diğer Gereçler

1. BD Vacutainer, CPT™ Tüpler, (Becton-Dickinson, USA)
2. Soğutmalı Santrifüj (ALC, PK 120r, Milan, Italy)
3. Thoma Lamı
4. %5 CO₂' li ortam sağlayacak inkubatör (MCO-5AC CO₂ incubator, Sanyo, Japan)
5. Laminar flow steril kabin
6. Otomatik pipetler ve pipet uçları (Eppendorf Research, Eppendorf, Germany)
7. Phosphate buffered saline (PBS)
8. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA)
9. Distile su
10. Testlerin değerlendirilmesi için büyüteç
11. Hücre kültür vasatı GIBCO™ AIM-V (Invitrogen, USA)
12. Falcon tüp 15 cc (Becton-Dickinson, USA)
13. Falcon tüp 50 cc (Becton-Dickinson, USA)
14. Ependorf tüp 1,5 ml (Qiagen, Japan)

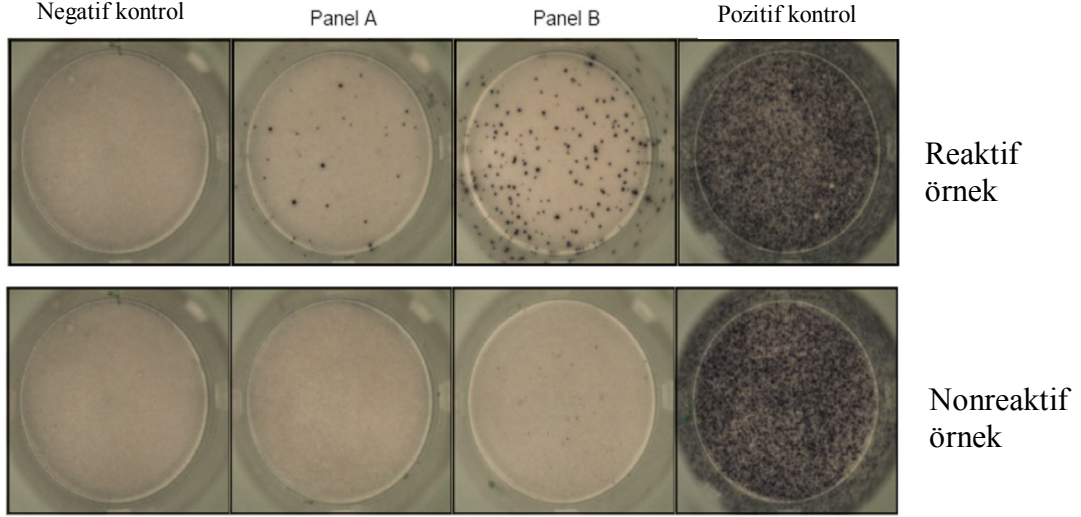
3.3.3. Testin Yapılışı

1. Testin uygulanacağı hastadan 8 cc periferik venöz kan içerisinde Ficoll-Hypaque bulunan test kitinde sağlanan tüplere alındı.
2. Alınan kan örneğinden daha sonra ficoll-santrifüj yöntemi ile periferik mononükleer hücreleri ayrıldı.
3. Ayrılan mononükleer hücreler Thoma lamında sayıldı.

4. T-SPOT.*TB* plaklarında ilk çukurcuk negatif kontrol, ikinci çukurcuk Panel A (ESAT-6 antijeni), üçüncü çukurcuk Panel B (CFP-10 antijeni) ve dördüncü çukurcuk ise pozitif kontrol içindir. Anti-IFN- γ monoklonal antikoları ile kaplı T-SPOT.*TB* plağındaki her bir kuyucuğa 250.000 hücre eklendi. Negatif kontrol kuyucuğuna sadece hücre konuldu ve üzerine herhangi bir antijen eklenmedi, pozitif kontrol çukurcuğuna ise hücre konuldu ve hücreler daha sonra genel bir T-hücre uyarıcısı olan fitohemaglutinin (PHA) ile uyarıldı, diğer iki antijen çukurcuklarına Panel A ve Panel B olarak çalışma kiti içinden çıkan antijen solüsyonları eklendi.
5. Daha sonra T-SPOT.*TB* plağı 37°C 'de % 5 CO₂ 'li etüv 16-20 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyondan sonra kuyucuklar 4 kez 200 μ l PBS ile yıkandı.
7. 50 μ l konjugat solusyonu tüm kuyucuklara eklendi.
8. 4 °C de 60 dakika inkübe edildi.
9. İnkübasyondan sonra kuyucuklar 4 kez 200 μ l PBS ile yıkandı.
10. 50 μ l substrat solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi.
11. 7 dakika oda ısısında inkübe edildi.
12. Kuyucuklar distile suyla yıkandı.
13. Daha sonra çukurcukların zemininde oluşan spot (noktalar) tarafımızdan gözle sayıldı.

3.3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Testin geçerli sayılabilmesi için pozitif kontrol kuyucuğunda en az 20 noktanın olması ve negatif kontrolde 10'dan az sayıda nokta olması gerekmektedir. Bu koşulları sağlamayan test sonuçları "belirsiz" olarak değerlendirildi.
2. Bu kriterleri sağlayan test panelinde negatif kontrol kuyucuğundaki spot sayısı 0-5 arasında ise, her hangi bir antijen kuyucuklarındaki spot sayısı negatif kontroldekinden 6 veya daha fazla ise test pozitif olarak kabul edildi.
3. Negatif kontrol kuyucuğunda saptanan spot sayısının 6 ve daha fazla olduğu durumlarda, antijen kuyucuklarında spot sayısı negatif kontroldekinin iki katı olduğunda test pozitif olarak kabul edildi.



Şekil 3.2. Üst panelde pozitif, alt panelde negatif bir test sonucu izlenmektedir.

3.4. Plevral Sıvı Analizi ve T-SPOT. TB

3.4.1. Gerekli Malzeme ve Gereçler

1. Soğutmalı Santrifüj (ALC, PK 120r, Milan, Italy)
2. Thoma Lamı
3. %5 CO₂' li ortam sağlayacak inkubatör (MCO-5AC CO₂ incubator, Sanyo, Japan)
4. Laminar flow steril kabin
5. Otomatik pipetler ve pipet uçları (Eppendorf Research, Eppendorf, Germany)
6. Phosphate buffered saline (PBS)
7. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA)
8. Distile su
9. Testlerin değerlendirilmesi için büyüteç
10. Hücre kültür vasatı GIBCO™ AIM-V (Invitrogen, USA)
11. Falcon tüp 50 cc (Becton-Dickinson, USA)
12. Ependorf tüp 1,5 ml (Qiagen, Japan)

3.4.2. Plevral Sıvıda Testin Yapılışı

1. Alınan plevral sıvı örneği en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılarak analize başlandı.
2. Plevral sıvı mononükleer hücreleri Ficoll- Hypaque kullanılarak ayrıştırıldı.
3. Anti-IFN- γ monoklonal antikorları ile kaplı T-SPOT.TB plağındaki her bir kuyucuğa 250.000 plevral sıvı mononükleer hücresi eklendi.
4. Serumda çalışılan yöntemle T-SPOT.TB testine devam edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Bu araştırmada değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Sürekli gözlem değerlerinden oluşan değişkenler bakımından gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ve ortanca değer olarak ifade edildi. Kategorik verilerin analizinde Fisher-Exact test, Pearson ki-kare testi ve frekansın düşük olduğu hücreler için G testi kullanıldı. Sonuçlar n ve Yo olarak ifade edildi. $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri setinin analizinde SPSS 13.0 istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Kalp yetmezliğine bağlı plevral efüzyonu olan hastalar (grup I, n:20) ve TB plörezi tanısı konan hastalardan (grup II, n:10) oluşan toplam 30 olgu araştırmaya dahil edildi. Tüm olguların TCT'leri, serum ve plevral sıvı ELISPOT (T-SPOT.TB) testleri yapıldı.

Grup genelinde yaş ortalaması 65.3 ± 18.7 ve kadın/erkek oranı 12/18 idi ($p=0.253$). %56.7 olgunun BCG aşısı vardı. Gruplar arasında BCG aşılı olma durumları arasında fark yoktu ($p=0.0119$). Kontrol grubunda olan 20 hastanın 6'sında sigara öyküsü varken, TB plörezili 10 hastanın 7'sinde sigara öyküsü mevcuttu ($p>0.05$). Araştırmaya alınan olguların demografik özellikleri Tablo 4.1'de izlenmektedir.

Tablo 4.1. Sosyodemografik özellikler

Değişkenler	Grup I	Grup II	Toplam
Yaş	73.2 ±12.12	49,6±20.1	65.3 ± 18.7
Cinsiyet(K/E)	10/10	2/8	12/18
BCG aşısı (var, %)	45	80	56,7 (%)
TCT (mm)	5.1 ± 7.3	15.4 ± 3.2	8,5 ± 7.9
Sigara öyküsü (var/yok)	6/14	7/3	43.3:56.7 (%)
Sayı (n)	20	10	30

Değerler ortalama±SS veya n(%) olarak verilmiştir. K:kadın, E:erkek, BCG: Bacille Calmette-Guérin, TCT: tüberkülin cilt testi

Araştırmaya alınan olguların TCT sonuçları (T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın BCG Aşılı Bireylerde TCT yorumlama kriterlerine göre) ve gruplara göre dağılımı Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Gruplara göre serum TCT sonuçları

TCT	Grup I	Grup II	Toplam
TCT (+)	3(15)	7 (70)	10
TCT (-)	17(85)	3 (30)	20
Sayı (n)	20	10	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir. TCT: Tüberkülin Cilt Testi

T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın BCG Aşılı Bireylerde TCT yorumlama kriterlerine göre TCT'nin 15 mm ve üzerinde olduğu, BCG aşısız bireylerde 10 mm ve üzerinde olduğu durumlar "tüberküloz enfeksiyonu" olarak kabul edilmektedir. Transüdatif efüzyonu olan hastaların oluşturduğu Grup I'deki 20 hastanın 3'ünde (%15) TCT pozitifliği saptanırken, TB plörezili olgularda TCT 10 olgunun 7'sinde (%70) pozitif izlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.3. Grup genelinde TCT ve serum T-SPOT.TB test sonuçlarının karşılaştırılması

T-SPOT.TB	TCT pozitif	TCT negatif	Toplam
T-SPOT.TB (+)	8(80)	3 (15)	11
T-SPOT.TB (-)	2(20)	16 (80)	18
T-SPOT.TB (tanımsız)	-	1 (5)	1
Sayı (n)	10	20	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir. TCT: Tüberkülin Cilt Testi

Tablo 4.4. Grup genelinde TCT ve plevra T-SPOT.TB test sonuçlarının karşılaştırılması

T-SPOT.TB	TCT pozitif	TCT negatif	Toplam
T-SPOT.TB (+)	8(80)	3 (15)	11
T-SPOT.TB (-)	-	14(70)	14
T-SPOT.TB (tanımsız)	2(20)	3 (15)	5
Sayı (n)	10	20	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir

Grup genelinde TCT ve serum-plevra T-SPOT.TB test sonuçları Tablo 4.3 ve 4.4’de izlenmektedir. Serum T-SPOT.TB testi pozitif saptanan 11 hastanın 8’inde (%73) TCT pozitif saptanırken, serum T-SPOT.TB testi negatif saptanan 18 hastanın 16’sında (%88) TCT negatif saptandı. Plevra T-SPOT.TB testi pozitif saptanan 11 olgunun ise 8’inde (%73) TCT pozitifliği saptandı.

Tablo 4.5. Gruplara göre serum T-SPOT.TB test sonuçları

T-SPOT.TB	Grup I	Grup II	Toplam
T-SPOT.TB (+)	3(15)	8 (80)	11
T-SPOT.TB (-)	17(85)	1 (10)	18
T-SPOT.TB (tanımsız)	-	1 (10)	1
Sayı (n)	20	10	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir

Tablo 4.5’de araştırmaya katılan tüm olgular T-SPOT.TB sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak izlenmektedir. Kontrol grubundaki 20 hastanın 3’ünde (%15) ve TB plörezili grubundaki 10 hastanın 8’inde (%80) serum T-SPOT.TB sonuçları pozitif saptandı ($p<0.05$). Gruplar arasında TB temas öyküleri açısından fark izlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 4.6. Gruplara göre plevra T-SPOT.TB test sonuçları

T-SPOT.TB	Grup I	Grup II	Toplam
T-SPOT.TB (+)	3(15)	8 (80)	11
T-SPOT.TB (-)	15(75)	-	15
T-SPOT.TB (tanımsız)	2 (10)	2 (20)	4
Sayı (n)	20	10	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir

Tablo 4.6’de araştırmaya katılan tüm olgular plevra T-SPOT.TB sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak izlenmektedir. Kontrol grubundaki 20 hastanın 3’ünde (%15) ve TB plörezili grubundaki 10 hastanın 8’inde (%80) serum T-SPOT.TB sonuçları pozitif saptandı ($p<0.05$).

Tablo 4.7. Gruplara göre serum ve plevra ESAT-6 ve CFP-10 sonuçlarının karşılaştırılması

T-SPOT.TB	Serum ESAT-6		Serum CFP-10		Plevra ESAT-6		Plevra CFP-10	
	pozitif	negatif	pozitif	negatif	pozitif	negatif	pozitif	negatif
Grup I	1	19	4	16	2	18	3	16
Grup II	7	3	8	2	10	-	8	1
Sayı (n)	8	22	12	18	12	18	11	17

ESAT-6: Early Secreted Antigenic Target 6kDa protein CFP-10: Culture filtrate protein

Tablo 4.7’de grupların serum ve plevra ESAT-6 ve CFP-10 sonuçlarının karşılaştırılması izlenmektedir. Gruplar arasında T-SPOT.TB sonuçları arasındaki fark göz önüne alındığında T-lenfositlerin ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verdikleri cevap arasında anlamlı fark izlendi ($p<0.05$). Ancak T-SPOT.TB pozitif olguların serum ve plevral sıvılarında ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verdikleri cevap pozitif-negatif olarak değerlendirildiğinde, sonuçlar arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.8. Gruplara göre serum ve plevra ESAT-6 ve CFP-10 panellerinde oluşan spot sayılarının karşılaştırılması

T-SPOT.TB	ESAT-6		CFP-10	
	serum	plevra	serum	plevra
Grup I	1.8	3	3.3	3.6
Grup II	10.2	18.2	12.5	17.8

Tablo 4.8’de ise panellerde oluşan spot sayılarına göre ESAT-6 ve CFP-10 sonuçları karşılaştırılmıştır. Grup I’de serum ve plevral sıvı ESAT-6 ve CFP-10 panellerinde oluşan spot sayıları arasında fark izlenmedi ($p=0.430$, $p=0.751$). TB plörezi gubunun oluşturduğu Grup II’de ise serum ve plevral sıvı ESAT-6 spot sayıları arasındaki fark ($p=0.01$), yine serum ve plevral sıvı CFP-10 spot sayıları arasındaki fark ($p=0.008$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Tablo 4.9. Gruplara göre plevral sıvı ADA sonuçları

ADA (U/L)	Grup I	Grup II	Toplam
<40	20(100)	6 (60)	26
40-70	-	3(30)	3
>70	-	1 (10)	1
Sayı (n)	20	10	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir. ADA: Adenozin deaminaz

Transüdatif plevral efüzyonu olan hastaların plevral sıvı ADA sonuçları 40 U/L'nin altında bulundu. TB plörezili 10 hastanın 6'sında (%60) ADA değeri <40 U/L, 3'ünde (%30) 40-70 U/L arasında saptanırken sadece 1 hastada (%10) >70 U/L olduğu izlendi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.10. Cinsiyete göre serum T-SPOT.TB test sonuçları

T-SPOT.TB	Cinsiyet		Toplam
	Kadın	Erkek	
T-SPOT.TB (+)	1(8.3)	10 (55.6)	11(36.7)
T-SPOT.TB (-)	11(91.7)	7 (38.9)	18(60)
T-SPOT.TB (tanımsız)	-	1(5.6)	1(3.3)
Sayı (n)	12	18	30

Değerler n(%) olarak verilmiştir

Grup genelinde cinsiyet açısından anlamlı fark izlenmezken T-SPOT.TB testi pozitif sonuçlanan 11 hastanın 10'unun erkek olduğu izlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.11. Grupların biyokimyasal analizlerinin karşılaştırılması

	TCC Serum x 10 ⁶ (ortanca)	TCC Plevra x 10 ⁶ (ortanca)	Plevra lenfosit (%)	Serum beyaz küre (UL)	Serum lenfosit (UL)
Grup I	22.5	29.4	27.8	7256	1221
Grup II	26.3	81.1	76.1	7281	1430

TCC: Toplam hücre sayısı

Grupların biyokimyasal analizleri Tablo 4.11’de izlenmektedir. Transüdatif efüzyonlu hastalar ve TB plörezi tanılı hastaların serum toplam hücre sayıları, serum beyaz küre ve serum lenfosit sayıları arasında anlamlı fark izlenmezken plevral sıvı toplam hücre sayıları ve plevral sıvı lenfosit yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05).

4.1. Transüdatif plevral efüzyonu olan hastalar (Grup 1)

Konjestif kalp yetmezliği ve transüdatif plevral efüzyonu olan toplam 20 hasta bu gruba dahil edildi. Tüm hastaların TCT ile serum ve plevral sıvı T-SPOT.TB testleri yapıldı. 20 hastanın 3’ünde (%15) TCT pozitif saptandı. TCT pozitif saptanan bir hastada hem serum T-SPOT.TB hem plevral sıvı T-SPOT.TB testinin pozitif olduğu izlendi. Diğer iki hastanın birinin serum T-SPOT. TB testi pozitif, plevral sıvı T-SPOT.TB testi sonucu tanımsız iken, üçüncü hastanın serum T-SPOT. TB testi negatif, plevral sıvı T-SPOT. TB testi sonucu pozitif saptandı. Bu gruptaki 20 hastanın plevral sıvı TB kültür sonuçları negatif idi.

Tablo 4.12. Transüdatif efüzyonlu hastalarda serum T-SPOT. TB test sonuçları- cinsiyet ilişkisi

T-SPOT.TB	Cinsiyet		Toplam
	Kadın	Erkek	
T-SPOT.TB (+)	-	3 (30)	3(15)
T-SPOT.TB (-)	10(100)	7 (70)	17(85)
T-SPOT.TB (tanımsız)	-	-	-
Sayı (n)	10	10	20

Değerler n (%) olarak verilmiştir

Transüdatif efüzyonlu hastalardan T-SPOT.TB testi pozitif saptanan 3 olgunun 3'ü de erkekti ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.13. Transüdatif efüzyonlu hastalarda plevral sıvı ve serum T-SPOT.TB test sonuçları

	<i>Plevral sıvı</i>			
	T-SPOT.TB (+)	T-SPOT.TB (-)	T-SPOT.TB (tanımsız)	Toplam
Serum T-SPOT.TB (+)	1	1	1	3
Serum T-SPOT.TB (-)	-	17	-	17
Serum T-SPOT.TB (tanımsız)	-	-	-	-
Toplam	1	18	1	20

Değerler n (%) olarak verilmiştir

4.2. TB plörezi tanılı hastalar (Grup II)

TB plörezi tanılı toplam 10 hasta gruba dahil edildi. Tüm hastaların TCT ile serum ve plevral sıvı T-SPOT.TB testleri yapıldı. 7 hastanın (%70) TCT sonucu pozitif saptandı. TCT pozitif saptanan 7 hastanın 6'sında serum T-SPOT.TB testi pozitif saptanırken bir hastanın test sonucu pozitif kontrol panelinde < 20 spot olduğu için negatif (anerjik) olarak yorumlandı. Gruptaki toplam 8 hastada serum T-SPOT.TB testi pozitif idi. Bir hastanın test sonucu negatif, bir hastanın ise tanımsız saptandı.

Tablo 4.14. TB plörezili hastalarda serum T-SPOT.TB test sonuçları- cinsiyet ilişkisi

T-SPOT.TB	Cinsiyet		Toplam
	Kadın	Erkek	
T-SPOT.TB (+)	1(10)	7(70)	8(80)
T-SPOT.TB (-)	1(10)	-	1(10)
T-SPOT.TB (tanımsız)	-	1(10)	1(10)
Sayı (n)	2	8	10

Değerler n(%) olarak verilmiştir

TB plörezi 10 hastanın 8'inde (%80) serum T-SPOT.*TB* testi pozitif saptanırken, bu hastaların 6'sının (%75) plevral sıvılarında T-SPOT.*TB* testi pozitifliği izlendi. Tüm grupta plevral sıvı T-SPOT.*TB* testi pozitifliği ise toplam 8 hastada (%80) saptandı.

Tablo 4.15. TB plörezi hastalarda plevral sıvı ve serum T-SPOT.*TB* test sonuçları

	<i>Plevral sıvı</i>			Toplam
	T-SPOT.<i>TB</i> (+)	T-SPOT.<i>TB</i> (-)	T-SPOT.<i>TB</i> (tanımsız)	
Serum T-SPOT.<i>TB</i> (+)	6	-	2	8
Serum T-SPOT.<i>TB</i> (-)	1	-	-	1
Serum T-SPOT.<i>TB</i> (tanımsız)	1	-	-	1
Toplam	8	-	2	10

Değerler n (%) olarak verilmiştir

TB plörezi tanısı olan 10 hastanın 6'sında akciğer TB birlikteliği mevcuttu. 4 hasta ise izole TB plörezi tanısıyla takip edilmekteydi. Hastaların %90'ında plevral sıvı wright boyamalarında lenfosit hakimiyeti izlendi. Tüm hastaların plevral sıvı ARB incelemesi negatif saptandı. 2 hastanın (%20) plevral sıvı TB kültüründe *M.tuberculosis* üremesi mevcuttu. 5 hastanın (%50) kapalı plevra biyopsi sonucu ise TB ile uyumlu idi. Akciğer TB ve TB plörezi birlikteliği olan 4 hastaya ise plevra biyopsisi yapılmadı.

Tablo 4.16. TB plörezi ADA ve T-SPOT.*TB* sonuçlarının karşılaştırılması

ADA (U/L)	Plevral T.SPOT.<i>TB</i>		
	T-SPOT.<i>TB</i> (+)	T-SPOT.<i>TB</i> (tanımsız)	Toplam
<40	5(50)	1(10)	6(60)
40-70	2 (20)	1 (10)	3 (30)
>70	1(10)	-	1(10)
Toplam	8 (80)	2 (20)	10

Değerler n (%) olarak verilmiştir. ADA: Adenozin deaminaz

TB plörezi T-SPOT.*TB* pozitifliği saptanan 8 hastanın 5'inde (%62.5) plevral sıvı ADA değerinin <40 U/L olduğu izlendi.

5. TARTIŞMA

MTB infeksiyonunda hücrel immünite önemli rol oynamaktadır (56). Günümüzde LTBI tanısında altın standart bir test bulunmamaktadır. Ülkemizde BCG aşısı rutin olarak uygulanmaktadır. Bu nedenle LTBI tanısında TCT'nin güvenilirliği ülkemizde düşüktür. TCT'nin BCG aşılı bireylerde ve NTM ile maruziyette yanlış sonuçlar verebilmesi nedeniyle yeni testlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda LTBI tanısında T-lenfosit kaynaklı IFN- γ araştırmasına dayalı in vitro bazı testler geliştirilmiştir. Bu testler TB antijenleri ile uyarıya yanıt olarak T-lenfositlerden salınan IFN- γ 'yı ölçerek hücre aracılı bağışıklık yanıtını değerlendirmektedir (43). LTBI tanısında altın standart bir tanı yöntemi bulunmadığı için yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin performanslarının değerlendirilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Aktif TB tanısında mikrobiyolojik kültürler altın standart testleri oluşturmaktadır. Yeni geliştirilen testlerin duyarlılığı, aktif TB hastalarında LTBI'nın var olduğu düşünülerek değerlendirilmektedir (57).

Ekstrapulmoner TB'de basil sayısı az ve ulaşılması zor yerlerde olduğu için bakteriyolojik tanı çoğunlukla konulamamaktadır. Bu araştırmaya dahil edilen 10 TB plörezi olgusunun plevral sıvı ARB değerlendirmeleri negatif saptanmış ve sadece 2 hastanın plevral sıvı kültürlerinde üreme olmuştur. TCT; BCG aşısı ve NTM infeksiyonları nedeniyle yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir ve çoğu zaman tanı için invaziv yöntemlere başvurmak gerekmektedir. Aktif TB'de IFN- γ salgılanmasına dayalı testlerin TCT ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olmasına karşın, serumdaki sonuçlar aktif TB ve LTBI'da ayırım yapamamaktadır (58). Aktif TB'de antijen spesifik efektör T lenfositleri, inflamasyonun olduğu bölgeye göç ederler ve periferik kanda sadece küçük bir yüzdeleri bulunur. İnflamasyon dokudaki ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine spesifik T-lenfositlerinin artmış birikimlerinin gösterilmesinin, aktif TB ve LTBI'nın ayırıcı tanısında önemli olduğu düşünülmektedir (59,60). Çalışmamızda MTB spesifik T-SPOT.TB testi kullanılarak antijen spesifik mononükleer hücrelerin periferik kan ve plevral sıvıda gösterilmesinin TB plöreziye hızlı tanıya katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Transüdatif plevral efüzyonu olan bireyler ile kesin TB plörezi tanısı konmuş bireylerin serum ve plevral sıvı T-SPOT.TB testlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda T-SPOT.TB testinin ve TCT'nin duyarlılık ve özgüllük hesapları olgu sayısı az olduğu için değerlendirilememiştir. Ancak serum T-SPOT.TB testi pozitif

saptanan 11 hastanın 8'inde (%73) TCT pozitifliği, serum T-SPOT.*TB* testi negatif saptanan 18 hastanın 16'sında (%88) TCT negatifliği saptanmış ve iki test arasında tutarlılık olduğu düşünülmüştür. IFN- γ salgılanmasına dayalı testlerin ekstrapulmoner TB tanısına ek katkı sağlayabileceği düşüncesinden yola çıkarak Munk ve ark. 22'si ekstrapulmoner TB'li 43 yeni tanı almış TB olgusunda T-SPOT.*TB* testini kullanmışlardır. 22 ekstrapulmoner TB olgusunun 18'inde ve 21 aktif pulmoner TB olgusunun 16'sında pozitif test sonucu elde etmişler ve her iki TB formunda da bu testin yüksek duyarlılığa sahip olduğunu belirlemişlerdir (61). Kim ve ark. da 32 ekstrapulmoner TB olgusunda TCT'nin %47.0 duyarlılığı varken, T-SPOT.*TB* testinin %94.0 duyarlılığı olduğunu saptamışlardır (62). TB plörezili olgularda T-SPOT.*TB* testini araştıran en geniş seri ERS 2007'de yayınlanmıştır (54) ve bu çalışmadaki olgu sayısı sadece 20'dir. Çalışmamızda 6 aylık dönemde, referans merkezden olgu bulma konusunda destek alınmasına karşın 10 olguya ulaşılabilmıştır. Bildirilen bazı olgulara, plevra biyopsisi sırasında plevral sıvı tam boşaltıldığı için sonrasında tekrar torasentez yapılamamış, dolayısıyla hastalar çalışmaya dahil edilememiştir. Kesin tanı konması zorunluluğu nedeniyle olgu seçimi oldukça sınırlanmıştır. Ancak plevra biyopsisi ile eş zamanlı T-SPOT.*TB* testi çalışılması durumunda, TB'nin endemik olduğu ülkemizde, daha fazla sayıda TB plörezi olgusuna ulaşılabileceğini öngörmekteyiz.

TB plörezi de plevral sıvının mikroskopik incelemesi ve kültürü tanıya nadiren yardımcı olmaktadır. Tanı için genellikle plevra biyopsisinin ve bazen de torakoskopik veya torakotomik biyopsilerin alınması gerekmektedir. Çalışmamızda da TB plörezili olguların 6'sına plevra biyopsisi uygulanmış ve bu hastaların 5'inde TB plörezi tanısı konmuştur. Ancak bu yöntemin invaziv bir yöntem olduğu göz önüne alındığında, daha az invaziv tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. IFN- γ salgılanmasına dayalı testlerin tanıya katkı sağlayabileceği gibi (61, 62), plevral sıvıda IFN- γ düzeyinin ölçülmesi de sıklıkla tanı koymada kullanılmıştır. Plevral sıvıda IFN- γ salgılanmasına dayalı testlerin kullanılmasına yönelik yeterli veri yoktur. Losi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, klinik olarak TB plörezi düşünülen 20 hasta ve TB dışı tanı 21 hastada periferik kan mononükleer hücreleri ve plevral sıvı mononükleer hücrelerinde T-SPOT.*TB* testi değerlendirilmiş ve testin sensitivitesinin periferik kan için %90, plevra sıvısı için %95, spesifitesinin periferik kan için %67, plevral sıvısı için %76 olduğu saptanmıştır (54). Wilkinson ve ark.'nın yaptığı çalışmada da TB plörezi olan hastaların plevral sıvılarında ESAT-6 antijenine karşı oluşmuş T-lenfositleri sayısının, serumdaki ESAT-6 antijenine karşı oluşmuş T-lenfositleri sayısından 15 kat fazla olduğu gösterilmiştir (60).

Çalışmamızda TB plörezi tanısı konan olguların %80'inde serum ve plevral sıvıda T-SPOT.*TB* testinin pozitifliği literature bilgilerine paralel bulunmuştur.

IFN- γ salınım temelli testler ile, ülkemiz gibi TB'nin endemik olduğu bölgelerde, endeminin olmadığı ülkelere oranla daha düşük duyarlılık ve özgüllük değerleri elde edildiği bilinmektedir. Bu bölgelerdeki farklı TB prevalans oranları ve NTM dağılımının bölgesel farklılık göstermesi, testin özgüllük ve duyarlılık sonuçlarını etkilemektedir. Düşük endemik bölgelerde testin özgüllük ve duyarlılığı tama yakınken, ülkemiz gibi endemik bölgelerde testin özgüllüğü daha düşük saptanmaktadır. Bu nedenle, endemik bölgelerde daha özgün ve duyarlı tanı yöntemlerine gerek olduğu açıktır.

Tüm çalışma grubunun %36.6'sında serum T-SPOT.*TB* testine, %33.3'ünde TCT'ye pozitif yanıt saptandı. Serum ve plevral sıvı T-SPOT.*TB* testlerine pozitif yanıt aynı oranlarda izlendi. Olguların %60'ı serum T-SPOT.*TB* testine negatif yanıt verirken %66'sında TCT'ye negatif yanıt saptandı. TCT'ye yanıtın beklenenden düşük olmasının nedeninin, BCG aşılmasının rutin yapıldığı ülkemizde olgularımızın ancak %56.7'sinde BCG aşısının saptanması olabileceği düşünüldü. Tüm çalışma grubunda T-SPOT.*TB* testi pozitif saptanan 11 hastadan 10'unun (%90.9) erkek hasta olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.008$). Ancak bu farkın TB plörezi grubunu oluşturan gruptaki erkek hasta fazlalığına atfedilebileceği düşünüldü (erkek/kadın: 8/2).

Çalışmamızda kesin TB plörezi tanısı olan 10 hastanın 6'sında (%60) hem serum T-SPOT.*TB* hem de plevra T-SPOT.*TB* testi pozitif saptandı. 2 hastanın ise plevra T-SPOT.*TB* testi pozitif iken bir hastanın serum T-SPOT.*TB* testi tanımsız, diğer hastanın ise pozitif kontrolde <20 spot olduğu için negatif kabul edildi. 2 (%20) hastanın serum T-SPOT.*TB* sonucu pozitif saptanmasına rağmen plevral T-SPOT.*TB* sonucu negatif kontrolde >10 spot olduğu için tanımsız olarak kabul edildi. Ancak bu durumun yoğun antijen cevabına bağlı olduğu düşünüldü. Kontrol grubunda ise bu oran serum ve plevral sıvı için %15 olarak izlendi. Transüdatif efüzyonu olan 20 hastanın 2'sinde (%10) hem serum T-SPOT.*TB* hem de plevra T-SPOT.*TB* testi pozitif saptandı. Yine 1 (%5) hastanın serum T-SPOT.*TB* sonucu pozitif saptanırken plevral T-SPOT.*TB* sonucu tanımsız olarak izlendi. 1 (%5) hastanın ise plevra T-SPOT.*TB* sonucu pozitif izlenirken serum T-SPOT.*TB* sonucu negatif saptandı. Bu dört hastanın 3'ünün TCT'si pozitif saptandı, 1'inin ise anejrik olduğu izlendi ve kontrol grubundaki pozitif T-SPOT.*TB* cevaplarının LTBI'ya bağlı olduğu düşünüldü.

Kontrol grubunda ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine spesifik T lenfositleri cevabında serum ve plevral sıvıda fark izlenmedi. Ancak TB plörezili hastalarda literatürle

uyumlu olarak plevra ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verilen cevabın serum ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine verilen cevaba göre anlamlı olarak yüksek olduğu izlendi. Yine toplam hücre sayısında, kontrol grubunda serum ve plevra arasında fark saptanmazken TB plörezide serum ve pleval sıvıda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı. Bu durumun kontrol grubunun transüdatif efüzyonlu hastalardan oluşmasına bağlı olduğu düşünüldü. Ancak TB plörezili gruba baktığımızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da pleval sıvı toplam hücre sayısının serum total hücre sayısına göre yaklaşık 3.5 kat yüksek olduğu izlenmiştir. Klinik çalışmalarda da MTB- spesifik T lenfositlerin serum ve plevaldaki sayılarının tek başına değerlendirilmesi yerine, serum ve pleval sıvılardaki sayılarının karşılaştırılmasının aktif TB plörezi ve LTBI ayırıcı tanısında daha yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde pleval sıvı ADA düzeyinin 70 U/L'nin üzerinde olması yüksek olasılıkla tüberkülozu düşündürürken, 40 U/L'nin altında olmasının tüberkülozu neredeyse ekarte ettirdiği ancak bunun kesin bir ekartasyon olmadığı bildirilmektedir (52). Ferrer ve ark.'ı beş yıl süreyle takip ettiği 40 idiyopatik eksüdatif pleval sıvılı ve ADA'nın 43 U/L'nin üzerine çıkmayan hastaların takibinde hiçbirinde TB saptamadıklarını bildirmişlerdir (63). TB plörezi tanısında ADA'nın değeri ülke koşullarına ve TB prevalansına göre değişir. Greco ve ark.'nın meta-analizinde prevalansın düşük veya orta olduğu ülkelerde negatif prediktif değerin yeterli, pozitif prediktif değerin ise düşük olduğu, buna karşın prevalansın yüksek olduğu ülkelerde pozitif prediktif değerin %99'lara ulaştığı bildirilmiştir (64). Çalışmamızda TB plörezi grubundaki hastaların %60'ında ADA değeri < 40 U/L saptandı. Bu sonuç, pleval sıvı ADA düzeyleri düşük olduğunda, tanısız yorumlardan kaçınılması gerektiğini düşündürdü.

6. SONUÇ

T-SPOT.TB testinin öncelikli kullanım alanı LTBI tanısının konulmasıdır. Aktif TB tanısında da son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır. İnvaziv olmayan yöntemlerle tanısız zorlukların yaşandığı TB plörezide de T-SPOT.TB testinin serum ve plevrada uygulanarak, MTB-spesifik T lenfositlerin plevral sıvıdaki sayılarının daha yüksek olduğunun gösterilmesinin, TB plörezi tanısına katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Bu araştırma, TB plörezili olgu sayısı az olmasına rağmen, toplam hücre sayısı ve antijen spesifik T lenfositleri sayısının, plevral sıvıda seruma göre yüksek saptanmasının tanısız anlamı olduğunu desteklemiştir.

TB’de ekstrapulmoner tutulumun daha az oranda karşılaşılan bir sorun olması nedeniyle, T-SPOT.TB testinin plevral sıvılarda değerini araştırabilmek için endemik bölgelerde bile, çok merkezli ve yeterli sürede yapılan çalışmalarla yüksek olgu sayılarına ulaşılabileceği, çalışmamızdan çıkardığımız diğer bir sonuçtur.

7. KAYNAKLAR

1. Cristopher C. Whalen. Diagnosis of latent tuberculosis infection. *JAMA*; 2005; 293, 22: 2785–87.
2. Lalvani A. Spotting latent infection: the path to beter tuberculosis control. *Thorax*, 2005; 20: 916–18.
3. Brewer T. F , Heymann J. S. To control and beyond: Moving towards eliminating the global tuberculosis threat. *JECH* 2004; 58: 822–25.
4. Global TB Factsheet 2005. (www.who.int/tb/publications/2005) Erişim tarihi: 25.05.2009
5. Kılıçaslan Z. Akciğer tüberkülozu ve atipik mikobakteri infeksiyonları. Akciğer Hastalıkları (Arseven O). 1’inci baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 2002: 283-301.
6. Global TB Factsheet 2009 (http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/flyer09.pdf) Erişim tarihi :15.05.2009
7. Üner S, Melek A. Hacettepe Toplum Hekimliği Bülteni. Ocak 2003. Sayı 1.
8. Gedikoğlu S. Mycobacterium. Klinik Mikrobiyoloji. (Kılıçturgay K). 2’nci baskı. Bursa, Güneş& Nobel Tıp Kitapevleri 1994: 67-75.
9. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun: 48-58.
10. Dannenberg MD Jr, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication in: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Ed: Bloom BR. 1994 American Society for Microbiology, Washington DC.459-483.

11. Iseman MD. Klinisyenler İçin Tüberküloz Klavuzu. Çeviren: Ş. Özkara. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 2002; Bölüm 2: 21–49.
12. Iseman MD. A clinician's guide to tuberculosis. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins; 2000: 63-96.
13. Dannenberg AM Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989; 11:369-78.
14. Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis. The first one hundred (and twenty –three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:251-56.
15. Chan J, Kaufmann SHE. Immune mechanisms of protection.in: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Ed: Bloom BR. 1994 American Society for Microbiology, Washington DC.389-415.
16. Kauffman SHE How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunol* 2001; 1(1): 20-30.
17. Li B, Rossman MD, Imir T, Oner-Eyuboglu AF, Lee CW, Biancaniello R, Carding SR. Disease-specific changes in $\gamma\delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *The Journal of Immunol* 1996; 157: 4222-29.
18. Li B, Bassiri H, Rossman MD, Kramer P, Eyuboglu AFO, Torres M, Sada E, Imir T, Carding SR. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human $\gamma\delta$ T cells: A mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *The Journal of Immunol* 1998; 161: 1558-67.
19. Ozbal Y. Immunity of tuberculosis. *Erciyes Medical Journal* 2006; 28(1): 25-34.
20. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun: 397-401.
21. ATS: Diagnostic standarts and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases. *Am Rev Resp Dis* 1981; 123: 343- 58.
22. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-47.
23. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R et al. Muticenter study of a commerical, automated poymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 724-31.
24. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2853-60.
25. D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1832-34.
26. Bonington A, Strang G, Klapper PE et al. Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculosis meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1251-54.
27. Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2699-2703.
28. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393-97.

29. Down JA, O'Connell MA, Dey MS et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 860-65.
30. Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F et al. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3082-85.
31. Ruiz-Serrano MJ, Albadalejo J, Martinez-Sanchez L, Bouza E. LC. A diagnostic alternative for the early detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 259-64.
32. Viinanen AH, Soini H, Marjamaki M, Liippo K, Viljanen MK. Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacteriosis. *Ann Intern Med* 2000; 4: 279-83.
33. Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N et al. Comparison of the ligase chain reaction with solid and liquid culture media for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis* in nonrespiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1998; 17: 767-72.
34. Blumberg HM, Leonard MK Jr, Jasmer RM. Update on treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *JAMA* 2005; 293(22): 2776-84.
35. Schluger NW. Novel approaches to the rapid diagnosis of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM, ed. Tuberculosis 2nd Edition. *Lippincott Williams & Wilkins* 2004, Philadelphia, USA: 177-181.
36. Daniel TM. The immunology of tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980;1:189-201.
37. Soysal A, Bakır M. Diagnosis in tuberculous infections Tuberculin Skin Test. *J Pediatr Inf* 2007; 1: 27-32.
38. Harboe M. Antigens of PPD, old tuberculin and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studies by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis* 1981;124: 80-87.
39. Snider DE Jr. Bacille Calmette-Guerin vaccination and tuberculin skin tests. *JAMA* 1985; 253: 3438-39.
40. Centers for Disease Control. Use of BCG vaccines in the control of tuberculosis: a joint statement by the ACIP and the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* 1988;37: 663-75.
41. Thompson NJ, Glassroth JL, Snider DE Jr, et al. The booster phenomenon in serial tuberculin testing. *Am Rev Respir Dis* 1979;119: 587-97.
42. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 761-76.
43. Çiledağ A, Çelik G. Tüberküloz plevral efüzyonlarda tanısal belirteçler. *Türk Toraks Derneği Plevra Bülteni* Cilt:2. Sayı:3. Yıl 2008.
44. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st Century: New tools to tackle an old enemy. *Chest* 2007; 131: 1898-1906.
45. Çelik Ü, Kocabaş E. Tüberküloz tanısında yeni bir yöntem: İnterferon-gama araştırmasına dayanan testler. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2007; 55(1): 108-17.
46. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-95.
47. Türkiye'de Verem Savaşı 2007 raporu. www.verem.org.tr
48. A Güntülü, Alataş F, Metintaş M, Metintaş S, Uçgun İ, Erginel S, Harmancı E. Tüberküloz Plörezi Olguların Genel Özellikleri. *Toraks Dergisi* 2002; 3(1): 45-51.
49. Nıksarlıoğlu Y.Ö, Çöplü L. Tüberküloz plörezi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun:119-22.

50. Mault J R, Pomerantz M. Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. *Chest Surg Clin N Am.* 1999 Feb; 9(1): 227-38
51. Light RW. Clinical manifestations and useful tests. In:Light RW(Ed). Pleural disease. Baltimore; Williams&Wilkins, 1995: 36-74.
52. Gopi A, Madhavan SM, Sharma S, Sahn S. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007;131: 880-89.
53. Selçuk T. İnvaziv tanı yöntemleri. Toraks Kitapları; Plevra Hastalıkları.(Gözü O, Köktürk O). 1'inci baskı. 2003; 92-101.
54. Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al. Use of a T-cell interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 2007; 30: 957-64.
55. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, Türkiye'de Tüberküloz Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Ankara, 2003.
56. Tully G, Kortsik C, Höhn H, et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunolog* 2005;174:2174-84.
57. Pai M, Dheda K, Cunningham J, Scano F, O'Brien R. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:428-38.
58. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174: 736-42.
59. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1048-54.
60. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pahtan A, et al. *Ex vivo* characterization of early secretory antigenic target-6 specific T cells at sides of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40:184-87.
61. Munk MM, Arend SM, Brock I, Otterhoff THM, Anderson P. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 175–76.
62. Kim S-H, Choi SJ, Kim H, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell–based assay for extrapulmonary tuberculosis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 2255-59.
63. Ferrer J, Munoz X, Orriols R, Light RW, Morell F. Evolution of idiopathic pleural effusion. A prospective, long term follow-up study. *Chest* 1996: 1508-1513.
64. Greco S, Girardi E, Masciengelo R, Capocchetta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon- γ measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: A meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 777-86.